

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043597**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |  |   |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента<br><b>2023.06.05</b> | (51) Int. Cl. <i>A61P 3/10</i> (2006.01)<br><i>A61P 29/00</i> (2006.01)<br><i>A61P 31/00</i> (2006.01)<br><i>A61P 37/02</i> (2006.01)<br><i>C07D 401/04</i> (2006.01)<br><i>C07D 401/14</i> (2006.01)<br><i>A61K 31/496</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки<br><b>202192595</b>                      |   |
| (22) Дата подачи заявки<br><b>2020.12.18</b>               |   |

---

(54) **ЛИГАНДЫ С-ПОДОБНОГО БЕЛКА 2 ЛАНТИОНИНА, КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ НИХ, И ТЕРАПИИ, ПРИМЕНЯЮЩИЕ ИХ**

---

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| (31) <b>62/951,906; 63/031,938</b>   | (56) WO-A1-2018141854 |
| (32) <b>2019.12.20; 2020.05.29</b>   | WO-A1-2016064445      |
| (33) <b>US</b>   | WO-A1-2019108418      |
| (43) <b>2021.11.12</b>   |                       |
| (86) <b>PCT/US2020/066063</b>  |                       |
| (87) <b>WO 2021/127472 2021.06.24</b>  |                       |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br><b>ЛЭНДОС БАЙОФАРМА, ИНК. (US)</b>                      |                       |
| (72) Изобретатель:<br><b>Бэссэйгэйния-Риэра Джозеп, Лебер<br/>Эндрю, Хонтэсиллэс Ракель (US)</b> |                       |
| (74) Представитель:<br><b>Медведев В.Н. (RU)</b>   |                       |

- 
- (57) Представлены соединения, которые нацелены на путь С-подобного белка 2 лантионинсинтетазы. Соединения можно использовать для лечения ряда состояний, включая аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, хронические воспалительные заболевания, диабет и инфекционные заболевания, такие как волчанка, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, воспалительное заболевание кишечника, вирусные заболевания и неалкогольный стеатогепатит.

**043597**  
**B1**

**043597**  
**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области лечения заболеваний и нарушений. Более определенно, настоящее изобретение относится к классам биологически активных соединений для лечения ряда состояний, включая аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, хронические воспалительные заболевания, диабет и инфекционные заболевания, такие как волчанка, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, воспалительное заболевание кишечника, вирусные заболевания и неалкогольный стеатогепатит.

### Уровень техники

Лантионин-С-подобный белок 2 (LANCL2) (также называемый "лантионинсинтетаза С-подобный белок 2" или "лантионинсинтетазный компонент С-подобный белок 2") представляет собой мембранный рецептор, экспрессируемый в иммунных и эпителиальных клетках различных слизистых оболочек, включая дыхательные и ЖК, также как репродуктивные и нервные ткани, которые можно контролировать путем непосредственного связывания лигандов. Активация пути LANCL2 оказалась полезной при множественных аутоиммунных, воспалительных и метаболических нарушениях, начиная от гликемического контроля и чувствительности к инсулину при диабете до повышения выживаемости и регулирующих эффектов при вирусных и бактериальных инфекционных заболеваниях, до подавления воспаления при воспалительном заболевании кишечника.

Во всем мире растет заболеваемость аутоиммунными заболеваниями, такими как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), системная красная волчанка, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, псориаз и рассеянный склероз. Между тем, другие хронические заболевания метаболического происхождения, включая преддиабет, диабет 2 типа и метаболический синдром, по оценкам, поражают почти половину взрослого населения США. В отношении этих нарушений текущие способы лечения обладают умеренной эффективностью с потенциалом тяжелых побочных эффектов, таких как сердечный приступ и инсульт (ТЗД для диабета 2 типа) или повышенная частота возникновения рака и инфекции (биопрепараты для воспалительных заболеваний кишечника и других аутоиммунных заболеваний) и без особого повышения общего качества жизни. Диабет 1 типа не имеет одобренных лекарственных препаратов, кроме пожизненной инсулиновой терапии. Другие заболевания, такие как рассеянный склероз и системная красная волчанка, имеют очень ограниченные возможности замедлить прогрессирование заболевания до изнурительных физических состояний, требующих трансплантации органов и полного ухода за больными. Путь LANCL2 предлагает инновационное решение для этих заболеваний, нормализуя метаболизм, восстанавливая иммунологическую толерантность и подавляя воспаление, что способствует ухудшению прогноза при многих из этих заболеваний.

Абсцизовая кислота ("АБК") представляет собой одно из обнаруженных природных соединений, которые связываются с LANCL2. Огромное количество соединений описано в области синтетической органической химии. Различные соединения предоставлены с помощью следующих ссылок: WO 1997/036866 to Diana et al., WO 2006/053109 to Sun et al., WO 2006/080821 to Kim et al., WO 2007/019417 to Nunes et al., WO 2009/067600 и WO 2009/067621 to Singh et al., WO 2008/079277 to Adams et al., JP 2008/056615 to Urasoe et al., WO 2011/066898 to Stoessel et al., US 2013/0142825 to Bassaganya-Riera et al. и патент США № 7741367 to Bassaganya-Riera et al. Известно, что некоторые из соединений, описанных в этих ссылках, активируют путь LANCL2, а другие не активируют.

Предшествующие соединения, нацеленные на LANCL2, такие как BT-11, сильно ограничены желудочно-кишечным трактом с ограниченным системным воздействием. Хотя эта локализация может быть предпочтительной для лечения желудочно-кишечных нарушений и инфекций, необходимы дополнительные классы терапевтических средств на основе LANCL2 для лечения системных заболеваний и нарушений, не связанных с ЖКТ, с различными фармакокинетическими свойствами и эффективностью. BT-11 и его терапевтическое применение описаны в патенте США 9556146 to Bassaganya-Riera et al.; патенте США 9839635 to Bassaganya-Riera et al.; патенте США 10028950 to Bassaganya-Riera et al.; патенте США 10201538 to Bassaganya-Riera et al.; патенте США 10493072 to Bassaganya-Riera et al.; патенте США 10682349 to Bassaganya-Riera et al.; US 2019/0160100 A1 to Bassaganya-Riera et al.; Bissel et al. 2016 (Bissel P, Boes K, Hinckley J, Jortner BS, Magnin-Bissel G, Werre SR, Ehrich M, Carbo A, Philipson C, Hontecillas R, Philipson N, Gandour RD, Bassaganya-Riera J. Exploratory Studies With BT-11: A Proposed Orally Active Therapeutic for Crohn's Disease. *Int J Toxicol.* 2016 Sep;35(5):521-9); и Carbo et al. 2016 (Carbo A, Gandour RD, Hontecillas R, Philipson N, Uren A, Bassaganya-Riera J. An N, N-Bis(benzimidazolylpicolinoyl)piperazine (BT-11): A Novel Lanthionine Synthetase C-Like 2-Based Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem.* 2016 Nov 23;59(22):10113-10126); Leber et al. 2018 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Bassaganya-Riera J. Activation of LANCL2 by BT-11 Ameliorates IBD by Supporting Regulatory T Cell Stability Through Immunometabolic Mechanisms. *Inflamm Bowel Dis.* 2018 Aug 16; 24(9):1978-1991); Leber et al. 2019 *Int J Toxicol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Ehrich M, Davis J, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. Nonclinical Toxicology and Toxicokinetic Profile of an Oral Lanthionine Synthetase C-Like 2 (LANCL2) Agonist, BT-11. *Int J Toxicol.* 2019 Mar/Apr; 38(2):96-109); Leber et al. 2019 *J Immunol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. Oral Treatment with BT-11 Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Enhancing Regulatory T Cell Responses in the Gut. *J Immunol.* 2019 Apr 1; 202(7):2095-2104); и Leber et al. 2020 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Colombel JF, Chauhan J,

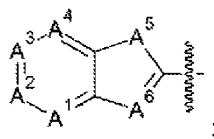
Ehrich M, Farinola N, Bassaganya-Riera J. The Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics Profile of BT-11, an Oral, Gut-Restricted Lanthionine Synthetase C-Like 2 Agonist Investigational New Drug for Inflammatory Bowel Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase I Clinical Trial. *Inflamm Bowel Dis.* 2020 Mar 4; 26(4):643-652.

Изобретение предоставляет соединения, которые были разработаны с помощью новых подходов в медицинской химии и проверены с использованием методов *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, чтобы сбалансировать способность селективно связываться с белком LANCL2 с системной биодоступностью и эффективностью. Эти соединения могут влиять на положительный ответ при различных болезненных состояниях, включая, но не ограничиваясь ими, аутоиммунные, хронические воспалительные, воспалительные, метаболические и инфекционные заболевания.

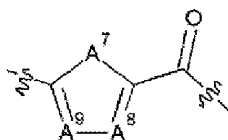
### Сущность изобретения

Изобретение предоставляет соединения формулы Z-Y-Q-Y' или их фармацевтически приемлемые соли, в которых

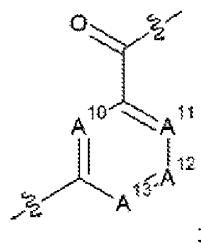
Z представляет собой:



Y представляет собой:

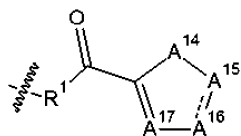


или

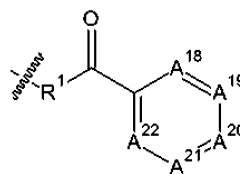


Q представляет собой пиперазин-1,4-диил или пиперазин-2,6-дион-1,4-диил;

Y' представляет собой:



или



--- между A<sup>15</sup> и A<sup>16</sup> отсутствует;

A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>8</sup>, A<sup>9</sup>, A<sup>11</sup>, A<sup>12</sup>, A<sup>13</sup>, A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> и A<sup>22</sup> представляют собой каждый C(R<sup>3</sup>);

каждый из A<sup>4</sup>, A<sup>19</sup> и A<sup>21</sup> независимо представляет собой C(R<sup>3</sup>) или N;

каждый из A<sup>6</sup>, A<sup>10</sup> и A<sup>17</sup> представляет собой N;

A<sup>5</sup> представляет собой N(R<sup>3</sup>) или O;

A<sup>7</sup> представляет собой N(R<sup>3</sup>);

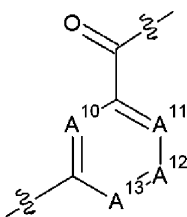
A<sup>14</sup> представляет собой O;

A<sup>15</sup> и A<sup>16</sup> представляют собой каждый C(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> или C<sub>3</sub> алкилен, необязательно замещенный одной или более C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкильными группами;

R<sup>3</sup> в каждом случае представляет собой независимо атом водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил или циано.

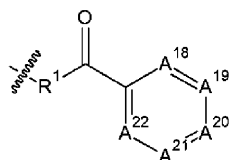
В некоторых вариантах A<sup>4</sup> представляет собой CH. В некоторых вариантах A<sup>5</sup> представляет собой NH. В некоторых вариантах Y представляет собой:



В некоторых вариантах Q представляет собой пиперазин-1,4-диил.

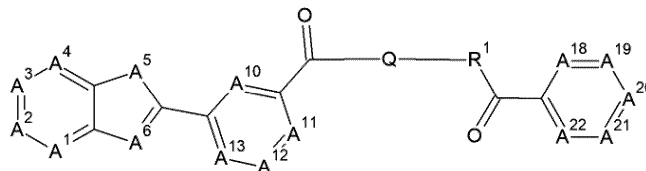
В некоторых вариантах Q представляет собой пиперазин-2,6-дион-1,4-диил.

В некоторых вариантах Y' представляет собой:



В некоторых вариантах  $R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_{1-3}-$  или  $-C(CH_3)_2-$ . В некоторых вариантах каждый из  $A^{19}$  и  $A^{21}$  представляет собой CH. В некоторых вариантах  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой циано.

В некоторых вариантах каждый  $R^3$  представляет собой атом водорода, за исключением того, что  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой атом водорода или циано. В некоторых вариантах Z-Y-Q-Y' представляет собой:



$A^4$  представляет собой CH;

$A^5$  представляет собой NH;

каждый из  $A^{19}$  и  $A^{21}$  представляет собой CH;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_{1-3}-$  или  $-C(CH_3)_2-$ ; и

каждый  $R^3$  представляет собой атом водорода, за исключением того, что  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой атом водорода или циано.

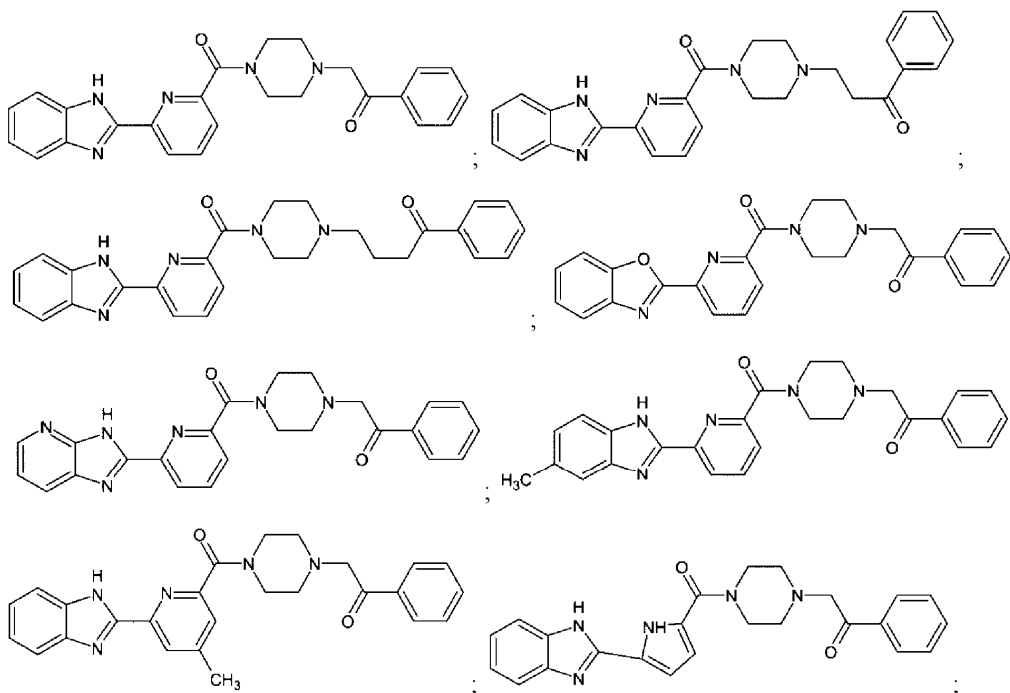
В некоторых вариантах Q представляет собой пиперазин-1,4-диил.

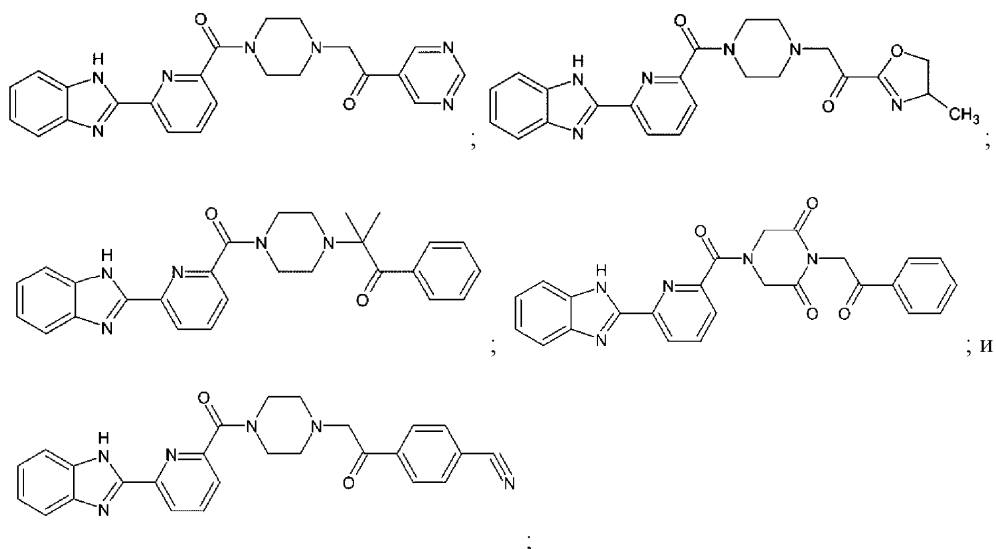
В некоторых вариантах Q представляет собой пиперазин-2,6-дион-1,4-диил.

В некоторых вариантах  $R^1$  представляет собой  $-(CH_2)-$ .

В некоторых вариантах  $R^1$  представляет собой  $-C(CH_3)_2-$ .

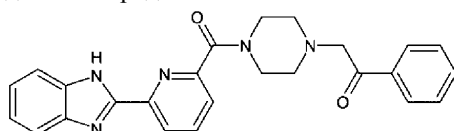
В некоторых вариантах  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой циано. В некоторых вариантах соединение выбрано из:





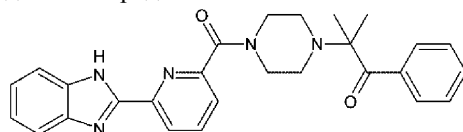
или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах соединение представляет собой:



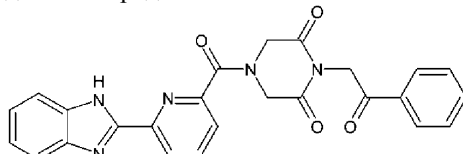
или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах соединение представляет собой:



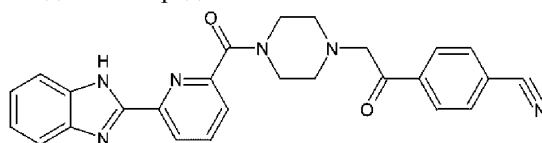
или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах соединение представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах соединение представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

Любой вариант, описанный выше или в другом месте в настоящем описании, может быть объединен с любым одним или более другими, не исключаящими друг друга вариантами, описанными выше или в другом месте в настоящем описании.

Изобретение предоставляет способы лечения состояния животного с помощью любого одного или более соединений, описанных в настоящем изобретении. Способы могут включать введение животному эффективного количества одного или более соединений, описанных в настоящем изобретении. Эффективное количество представляет собой количество, эффективное для лечения состояния животного. Состояние может включать любое одно или более состояний, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах состояние включает аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах состояние включает воспалительное заболевание. В некоторых вариантах состояние включает хроническое воспалительное заболевание. В некоторых вариантах состояние включает воспалительное заболевание кишечника, такое как язвенный колит и/или болезнь Крона. В некоторых вариантах состояние включает диабет. В некоторых вариантах состояние включает инфекционное заболевание. В некоторых вариантах состояние включает волчанку, такую как системная красная волчанка. В некоторых вариантах состояние включает синдром Шегрена. В некоторых вариантах состояние включает ревматоидный артрит. В неко-

торых вариантах заболевание включает диабет 1 типа. В некоторых вариантах состояние включает вирусное заболевание, такое как грипп, вирусная инфекция Зика и коронавирусная инфекция. В некоторых вариантах состояние включает неалкогольный стеатогепатит.

Цели и преимущества изобретения станут более очевидными из нижеследующего подробного описания предпочтительного варианта осуществления изобретения, сделанного вместе с прилагаемыми чертежами.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1А-1С. Расчетное прогнозирование связывания выбранных соединений с LANCL2 в ккал/моль.

Фиг. 2. Фармакокинетика ВТ-63 после перорального приема 10 и 40 мг/кг.

Фиг. 3. Иммунологическая валидация активности ВТ-63 в CD4<sup>+</sup> спленоцитах. Процентное содержание ИФН $\gamma$ <sup>+</sup>, ФНО $\alpha$ <sup>+</sup> и ИЛ10<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после обработки *in vitro* клеток ВТ-63 в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в клетках дикого типа и в клетках с дефицитом LANCL2. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

Фиг. 4А и 4В. Активность соединений в CD4<sup>+</sup> спленоцитах. Процентное содержание ИФН $\gamma$ <sup>+</sup> и FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после обработки *in vitro* клеток ВТ-63 и ВТ-62 при концентрациях 0,1, 1 и 10 микромоляр (фиг. 4А). Процентное содержание ИФН $\gamma$ <sup>+</sup> и ФНО<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после обработки *in vitro* клеток ВТ-104-А, ВТ-104-В и ВТ-104-С в концентрациях 0,1 микромоляр (фиг. 4В). Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

Фиг. 5. Эффективность ВТ-63 на модели NOD СД1. Ежедневный мониторинг уровня глюкозы в крови и процента гипергликемии у мышей NOD, получавших наполнитель или 10 или 20 мг/кг ВТ-63 ежедневно.

Фиг. 6. Иммунные эффекты ВТ-63 *in vivo* на модели NOD диабета 1 типа (СД1). Соотношение клеток селезенки, продуцирующих ИЛ10, и клеток, продуцирующих ИФН $\gamma$ , BCL6<sup>+</sup> ИЛ21<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и CD4<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> Т-клеток селезенки в возрасте 21 недели при пероральном введении наполнителя или 10 или 20 мг/кг ВТ-63 ежедневно.

Фиг. 7. Оценка биомаркера плазмы ВТ-63 на модели NOD СД1. Концентрации в плазме С-пептида, HbA1c, МСР-1 и ФНО в возрасте 21 недели при пероральном введении наполнителя или 10 или 20 мг/кг ВТ-63 ежедневно.

Фиг. 8. Эффективность ВТ-63 на модели СКВ, индуцированной TLR7/9. Антитела в плазме к двухцепочечной ДНК, уровни альбумина в моче, CD8<sup>+</sup> ИФН $\gamma$ <sup>+</sup> и ИЛ6<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> клетки селезенки после двух недель перорального введения наполнителя или 20 мг/кг ВТ-63.

Фиг. 9. Эффективность ВТ-63 на модели MDR1a<sup>-/-</sup> ВЗК. Собственная пластинка толстой кишки Th1, Th17, CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs и нейтрофилы после четырех недель перорального введения наполнителя или 20 мг/кг ВТ-63.

Фиг. 10. Сокращение системного воспаления у мышей Mdr1a<sup>-/-</sup>, получавших ВТ-63. Th1 и CD25<sup>+</sup> Tregs селезенки после четырех недель перорального введения наполнителя или 20 мг/кг ВТ-63.

Фиг. 11. Эффективность ВТ-63 на модели вирусной инфекции гриппа А у мышей. Индекс выживаемости и активности заболевания в течение 12 дней после инфицирования гриппом А (H1N1) при ежедневном пероральном введении наполнителя или 20 мг/кг ВТ-63.

Фиг. 12. Модуляция иммунного ответа легких на инфекцию гриппа А с помощью ВТ-63. ИЛ10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки легких, альвеолярные макрофаги, CD4<sup>+</sup> ФНО<sup>+</sup> Т-клетки и нейтрофилы на 12-й день после инфицирования при ежедневном пероральном введении наполнителя или 20 мг/кг ВТ-63.

Фиг. 13. Эффективность ВТ-63 на модели NZB/W F1 СКВ. Изменения массы тела по сравнению с исходным уровнем в течение 12 недель введения наполнителя или 20 мг/кг ВТ-63. Оценка белка в моче, антитела к анти-дцДНК в плазме и концентрация ИФН- $\alpha$  в плазме после 12 недель перорального введения наполнителя или ВТ-63 (20 мг/кг).

Фиг. 14. Иммунологические ответы на ВТ-63 на модели NZB/W F1. CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgM<sup>lo</sup> фолликулярные В-клетки селезенки, CD138<sup>hi</sup> CD19<sup>lo</sup> МНСII<sup>lo</sup> клетки плазмы, CXCR3<sup>+</sup> клетки плазмы, ИЛ6<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> миелоидные клетки, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs, CD4<sup>+</sup> ИЛ21<sup>+</sup> BCL6<sup>+</sup> фолликулярные Т-хелперы после 12 недель перорального введения наполнителя или ВТ-63 (20 мг/кг).

Фиг. 15. Дополнительные примерные соединения изобретения (ВТ-104-А, ВТ-104-В, ВТ-104-С), которые связываются с LANCL2 и которые можно использовать в любом способе, описанном в настоящей заявке. Превращение пиперазина в ВТ-63 в пиперазин-2,6-дион, как он присутствует в ВТ-104-А, или добавление гем-диметильных или нитрильных групп к ВТ-63, как присутствует в ВТ-104-В или ВТ-104-С, соответственно, служат для улучшения системного периода полувыведения целевого соединения за счет повышения устойчивости метиленовой группы в ВТ-63 к ферментативному метаболизму.

Фиг. 16А и 16В. Валидация *in vivo* эффективности ВТ-104-В на модели CCl<sub>4</sub> неалкогольного стеатогепатита. Масса печени (фиг. 16А) и показатель фиброза (фиг. 16В) после 4 недель инъекций тетрахло-рида углерода раз в две недели мышам, получавшим наполнитель и ВТ-104-В (20 мг/кг). Статистическая

значимость ( $P < 0,05$ ) отмечена звездочками.

Фиг. 17А-17С. Валидация *in vivo* эффективности ВТ-104-В на модели артрита, индуцированного коллагеном. Процентное содержание ИЛ17+ (фиг. 17А), ИФН $\gamma$ + CD4+ Т-клеток (фиг. 17В) и ФНО+ CD11b+ CD11c+ миелоидных клеток (фиг. 17С) в селезенках мышей с индуцированным коллагеном артритом после 4 недель ежедневного перорального введения наполнителя или ВТ-104-В (20 мг/кг). Статистическая значимость ( $P < 0,05$ ) отмечена звездочками.

Фиг. 18А-18С. Валидация *in vivo* эффективности ВТ-104-В на модели NZB/W F1 СКВ. Процентное содержание ИЛ17+ (фиг. 18А), ИЛ21+ (фиг. 18В) и CD25+ FOXP3+ CD4+ Т-клеток (фиг. 18С) в селезенке мышей NZB/W F1 после 12 недель ежедневного перорального введения наполнителя или ВТ-104-В (20 мг/кг). Статистическая значимость ( $P < 0,05$ ) отмечена звездочками.

#### **Подробное описание изобретения**

Если не указано иначе, в настоящем изобретении используются следующие определения.

Дисперсионный анализ (ANOVA): арифметический процесс для распределения общей вариации в наборах данных на определенные компоненты на основе источников вариации. Его использовали для определения, являются ли численные различия между группами лечения статистически значимыми.

Сопряженный диен: молекула, содержащая две двойные связи, разделенные одинарной связью.

Энантиомер: оптический изомер; химическая классификация молекул, основанная на их способности вращать плоскость поляризации по часовой стрелке (+) или против часовой стрелки (-).

По существу чистый: имеющий чистоту, по меньшей мере, 90 мас.%, предпочтительно, по меньшей мере, 95 мас.%, например, по меньшей мере, 98, 99% или приблизительно 100 мас.%.

ВЗК: воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) включает хроническое воспаление всего или части желудочно-кишечного тракта. ВЗК преимущественно включает язвенный колит и болезнь Крона. Оба обычно включают сильную диарею, боль, усталость и потерю веса. ВЗК может быть тяжело протекающим и иногда приводит к опасным для жизни осложнениям.

Язвенный колит (ЯК): ЯК представляет собой ВЗК, которое вызывает длительное воспаление и язвы (изъязвления) в самой внутренней выстилке толстой (ободочной) и прямой кишки.

Болезнь Крона: болезнь Крона представляет собой ВЗК, которое вызывает воспаление слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. При болезни Крона воспаление часто распространяется глубоко в пораженные ткани. Воспаление может поражать различные участки желудочно-кишечного тракта - толстый кишечник, тонкий кишечник или оба.

ИЛ-10: интерлейкин-10 (ИЛ-10), также известный как фактор ингибирования синтеза цитокинов человека (CSIF), представляет собой противовоспалительный цитокин. У человека ИЛ-10 кодируется геном IL10.

FOXP3: FOXP3 (вилочная головка P3), также известный как скурфин, представляет собой белок, участвующий в ответах иммунной системы. Член семейства белков FOX, FOXP3, по-видимому, действует как главный регулятор (фактор транскрипции) в развитии и функционировании регуляторных Т-клеток.

ФНО-альфа: фактор некроза опухоли (ФНО, кахексин или кахектин и ранее известный как фактор некроза опухоли альфа или ФНО $\alpha$ ) представляет собой цитокин, участвующий в системном воспалении, и является членом группы цитокинов, которые стимулируют острофазовую реакцию.

МСР1: моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1. Более старый термин для СС-цитокина, который имеет решающее значение для развития атеросклеротических повреждений, обнаруженных в эндотелиальных клетках, макрофагах и в гладкомышечных клетках сосудов пациентов, подвергающихся процедурам коронарного шунтирования. В настоящее время официально предпочтительным термином является хемокиновый (С-С мотив) лиганд 2.

Интерферон гамма: интерферон гамма представляет собой провоспалительный димеризованный растворимый цитокин, который является единственным членом класса интерферонов II типа.

Лейкоцитарная инфильтрация: лейкоцитарная инфильтрация относится к процессу перемещения или инфильтрации лейкоцитов в поврежденную ткань, чтобы начать процесс восстановления.

Диабет 1 типа: аутоиммунное заболевание, характеризующееся как хроническое состояние, при котором поджелудочная железа вырабатывает мало или совсем не вырабатывает инсулин в результате иммунологического разрушения инсулин-продуцирующих бета-клеток в панкреатических островках. Дефицит инсулина приводит к хронической гипергликемии, которая может вызвать повреждение органов, сокращение продолжительности жизни и снижение качества жизни. Заболевание также называют ювенильным диабетом или инсулинозависимым диабетом.

Системная красная волчанка: аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система реагирует на ядерные антигены и образует иммунные комплексы, которые могут агрегировать или вызывать повреждение многочисленных систем органов, включая кожу, суставы, почки, головной мозг, сердце и сердечно-сосудистую систему и другие органы.

Термин "атом галогена" относится к атому фтора, атому хлора, атому брома и атому иода. Атом фтора, атом хлора и атом брома являются предпочтительными.

Термин "гетероатом" относится к атому кислорода, атому серы и атому азота.

Термин "алкил" включает одновалентную линейную или разветвленную углеводородную группу, содержащую от одного до восьми атома(ов) углерода. Примеры включают метил, этил, н-пропил, изо-пропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, изогексил, н-гептил, н-октил и подобные. C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил является предпочтительным. C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил является еще более предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "алкил", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "алкенил" включает одновалентную линейную или разветвленную углеводородную группу, содержащую от двух до восьми атомов углерода и одну или более двойных связей. Примеры включают винил, аллил, 1-пропенил, 2-бутенил, 2-пентенил, 2-гексенил, 2-гептенил, 2-октенил и подобные. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил является предпочтительным. C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкенил является еще более предпочтительным.

Термин "алкинил" включает одновалентную линейную или разветвленную углеводородную группу, содержащую от двух до восьми атомов углерода и одну или более тройных связей. Примеры включают этинил, 1-пропинил, 2-пропинил, 2-бутинил, 2-пентинил, 2-гексинил, 2-гептинил, 2-октинил и подобные. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил является предпочтительным. C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкинил является еще более предпочтительным.

Термин "циклоалкил" включает циклоалкил, содержащий от трех до восьми атомов углерода. Примеры включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил и подобные. C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкил является предпочтительным.

Термин "циклоалкенил" включает циклоалкенил, содержащий от трех до восьми атомов углерода. Примеры включают циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил, циклооктенил и подобные. C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкенил является предпочтительным.

Термин "алкилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "алкилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают метилокси, этилокси, н-пропилокси, изопрпилокси, н-бутилокси, изобутилокси, втор-бутилокси, трет-бутилокси, н-пентилокси, изопентилокси, 2-пентилокси, 3-пентилокси, н-гексилокси, изогексилокси, 2-гексилокси, 3-гексилокси, н-гептилокси, н-октилокси и подобные. C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилокси является предпочтительным. C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилокси или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкилокси является еще более предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "алкилокси", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "алкенилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "алкенилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают винилокси, аллилокси, 1-пропенилокси, 2-бутенилокси, 2-пентенилокси, 2-гексенилокси, 2-гептенилокси, 2-октенилокси и подобные. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенилокси является предпочтительным. Кроме того, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкенилокси является еще более предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "алкенилокси", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "алкинилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "алкинилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают этинилокси, 1-пропинилокси, 2-пропинилокси, 2-бутинилокси, 2-пентинилокси, 2-гексинилокси, 2-гептинилокси, 2-октинилокси и подобные. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинилокси является предпочтительным. C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкинилокси является еще более предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "алкинилокси", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "циклоалкилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "циклоалкилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси, циклогептилокси и циклооктилокси. C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкилокси является предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "циклоалкилокси", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "циклоалкенилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "циклоалкенилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают циклопропенилокси, циклобутенилокси, циклопентенилокси, циклогексенилокси, циклогептенилокси и циклооктенилокси. C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкенилокси является предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "циклоалкенилокси", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "алкилтио" включает группу, в которой атом серы замещен одним "алкилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают метилтио, этилтио, н-пропилтио, изопрпилтио, н-бутилтио, изобутилтио, втор-бутилтио, трет-бутилтио, н-пентилтио, изопентилтио, 2-пентилтио, 3-пентилтио, н-гексилтио, изогексилтио, 2-гексилтио, 3-гексилтио, н-гептилтио, н-октилтио и подобные. C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилтио является предпочтительным. C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилтио является еще более предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "алкилтио", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.

Термин "алкенилтио" включает группу, в которой атом серы замещен одним "алкенилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают винилтио, аллилтио, 1-пропенилтио, 2-бутенилтио, 2-пентенилтио, 2-гексенилтио, 2-гептенилтио, 2-октенилтио и подобные. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенилтио является предпочтительным. C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкилтио является еще более предпочтительным. Когда указано количество атомов углерода, это означает "алкенилтио", имеющий число атомов углерода в пределах диапазона.





нилокси, циклогептилсульфонилокси и циклооктенилсульфонилокси. C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкенилсульфонилокси является предпочтительным.

Термин "алкилоксикарбонил" включает группу, в которой карбонил замещен одним "алкилокси", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают метилоксикарбонил, этилоксикарбонил, н-пропилоксикарбонил, изопрпилоксикарбонил, н-бутилоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил и н-пентилоксикарбонил. C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилоксикарбонил является предпочтительным. C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкилоксикарбонил является еще более предпочтительным.

Термин "алкенилоксикарбонил" включает группу, в которой карбонил замещен одним "алкенилокси", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают винилоксикарбонил, аллилоксикарбонил, 1-пропенилоксикарбонил, 2-бутенилоксикарбонил и 2-пентенилоксикарбонил. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкилоксикарбонил является предпочтительным.

Термин "алкинилоксикарбонил" включает группу, в которой карбонил замещен одним "алкинилокси", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают этинилоксикарбонил, 1-пропинилоксикарбонил, 2-пропинилоксикарбонил, 2-бутинилоксикарбонил и 2-пентинилоксикарбонил. C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкинилоксикарбонил является предпочтительным.

Термин "ацил" включает алкилкарбонил, в котором часть алкила представляет собой "алкил", как описано в настоящем изобретении, алкенилкарбонил, в котором часть алкенила представляет собой "алкенил", как описано в настоящем изобретении, алкинилкарбонил, в котором часть алкинила представляет собой "алкинил", как описано в настоящем изобретении, циклоалкилкарбонил, в котором часть циклоалкила представляет собой "циклоалкил", как описано в настоящем изобретении, арилкарбонил, в котором часть арила представляет собой "арил", как описано в настоящем изобретении, гетероарилкарбонил, в котором часть гетероарила представляет собой "гетероарил", как описано в настоящем изобретении, и неароматический гетероциклический карбонил, в котором часть неароматической гетероциклической группы представляет собой "неароматическую гетероциклическую группу", как описано в настоящем изобретении. "Алкил", "алкенил", "алкинил", "циклоалкил", "арил", "гетероарил" и "неароматическая гетероциклическая группа" могут быть замещены соответственно группами заместителей, представленными в виде "необязательно замещенного алкила", "необязательно замещенного алкенила", "необязательно замещенного алкинила", "необязательно замещенного циклоалкила", "необязательно замещенного арила", "необязательно замещенного гетероарила" и "необязательно замещенной неароматической гетероциклической группы", как описано в настоящем изобретении. Примеры ацильной группы включают ацетил, пропионил, бутироил, циклогексилкарбонил, бензоил, пиридинкарбонил и подобные.

Термин "необязательно замещенный amino" включает аминогруппу, которая может быть замещена одной или двумя группой(ами) "алкила", как описано в настоящем изобретении, "алкенила", как описано в настоящем изобретении, "алкинила", как описано в настоящем изобретении, "циклоалкила", как описано в настоящем изобретении, "циклоалкинила", как описано в настоящем изобретении, "арила", как описано в настоящем изобретении, "гетероарила", как описано в настоящем изобретении, "ацила", как описано в настоящем изобретении, "алкилоксикарбонила", как описано в настоящем изобретении, "алкенилоксикарбонила", как описано в настоящем изобретении, "алкинилоксикарбонила", как описано в настоящем изобретении, "алкилсульфонила", "алкенилсульфонила", "алкинилсульфонила", "арилсульфонила" и/или "гетероарилсульфонила", как описано в настоящем изобретении. Примеры необязательно замещенной аминогруппы включают amino, метиламино, диметиламино, этиламино, диэтиламино, этилметиламино, бензиламино, ацетиламино, бензоиламино, метилоксикарбониламино и метансульфониламино. Amino, метиламино, диметиламино, этилметиламино, диэтиламино, ацетиламино и метансульфониламино являются предпочтительными.

Термин "необязательно замещенный карбамоил" включает аминокарбонильную группу, в которой часть необязательно замещенного amino представляет собой "необязательно замещенный amino", как описано в настоящем изобретении. Примеры необязательно замещенной карбамоильной группы включают карбамоил, N-метилкарбамоил, N,N-диметилкарбамоил, N-этил-N-метилкарбамоил, N,N-диэтилкарбамоил, N-фенилкарбамоил, N-бензилкарбамоил, N-ацетилкарбамоил и N-метилсульфонилкарбамоил и т.д. Карбамоил, N-метилкарбамоил, N,N-диметилкарбамоил и N-метилсульфонилкарбамоил и т.д. являются предпочтительными.

Термин "необязательно замещенный сульфоамиоил" включает аминосульфонильную группу, в которой часть необязательно замещенного amino представляет собой "необязательно замещенный amino", как описано в настоящем изобретении. Примеры необязательно замещенной сульфоамиоильной группы включают сульфоамиоил, N-метилсульфоамиоил, N,N-диметилсульфоамиоил, N-этил-N-метилсульфоамиоил, N,N-диэтилсульфоамиоил, N-фенилсульфоамиоил, N-бензилсульфоамиоил, N-ацетилсульфоамиоил и N-метилсульфонилсульфоамиоил и т.д. Сульфоамиоил, N-метилсульфоамиоил, N,N-диметилсульфоамиоил и N-метилсульфонилсульфоамиоил и т.д. являются предпочтительными.

Термин "алкилен" означает линейную или разветвленную алкиленовую группу, содержащую от одного до восьми атома(ов) углерода. Примеры включают метилен, этилен, 1-метилэтилен, триметилен, 1-метилтриметилен, пентаметилен, гексаметилен и подобные. C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1,3</sub>-алкилены являются предпочтительными. C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкилен является еще более предпочтительным.

Термин "арил" включает ароматические моноциклические или ароматические конденсированные циклические углеводороды. Он может быть конденсирован с "циклоалкилом", как описано в настоящем изобретении, "циклоалкенилом", как описано в настоящем изобретении, или "неароматической гетероциклической группой", как описано в настоящем изобретении, в любом возможном положении. И моноциклическое кольцо, и конденсированное кольцо могут быть замещены в любом положении. Примеры включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, антрил, тетрагидронафтил, 1,3-бензодиоксолил, 1,4-бензодиоксанил и т.д. Фенил, 1-нафтил и 2-нафтил являются предпочтительными. Фенил является еще более предпочтительным.

Термин "неароматическая гетероциклическая группа" включает 5-7-членное неароматическое гетероциклическое кольцо, содержащее один или более гетероатом(ов), независимо выбранных из атомов кислорода, серы и азота, или полициклическое кольцо, образованное слиянием двух или более их колец. Примеры включают пирролидинил (например, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил), пирролинил (например, 3-пирролинил), имидазолидинил (например, 2-имидазолидинил), имидазолинил (например, имидазолинил), пиразолидинил (например, 1-пиразолидинил, 2-пиразолидинил), пиразолинил (например, пиразолинил), пиперидил (например, пиперидино, 2-пиперидил), пиперазинил (например, 1-пиперазинил), индолинил (например, 1-индолинил), изоиндолинил (например, изоиндолинил), морфолинил (например, морфолино, 3-морфолинил) и т.д.

Термин "гетероарил" включает 5-6-членное ароматическое кольцо, содержащее один или более гетероатом(ов), независимо выбранных из атомов кислорода, серы и азота. Он может быть конденсирован с "циклоалкилом", как описано в настоящем изобретении, "арилом", как описано в настоящем изобретении, "неароматической гетероциклической группой", как описано в настоящем изобретении, или другим гетероарилом в любом возможном положении. Гетероарильная группа может быть замещена в любом положении, когда она представляет собой моноциклическое кольцо или конденсированное кольцо. Примеры включают пирролил (например, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил), фурил (например, 2-фурил, 3-фурил), тиенил (например, 2-тиенил, 3-тиенил), имидазолил (например, 2-имидазолил, 4-имидазолил), пиразолил (например, 1-пиразолил, 3-пиразолил), изотиазолил (например, 3-изотиазолил), изоксазолил (например, 3-изоксазолил), оксазолил (например, 2-оксазолил), тиазолил (например, 2-тиазолил), пиридил (например, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил), пиразинил (например, 2-пиразинил), пиримидинил (например, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил), пиридазинил (например, 3-пиридазинил), тетразолил (например, 1Н-тетразолил), оксадиазолил (например, 1,3,4-оксадиазолил), тиадиазолил (например, 1,3,4-тиадиазолил), индолидинил (например, 2-индолидинил, 6-индолидинил), изоиндолинил (например, 2-изоиндолинил), индолил (например, 1-индолил, 2-индолил, 3-индолил), индазолил (например, 3-индазолил), пуринил (например, 8-пуринил), хинолидинил (например, 2-хинолидинил), изохинолил (например, 3-изохинолил), хинолил (например, 2-хинолил, 5-хинолил), фтаразинил (например, 1-фтаразинил), нафтилидинил (например, 2-нафтилидинил), хиноланил (например, 2-хиноланил), хиназолинил (например, 2-хиназолинил), циннолинил (например, 3-циннолинил), птеридинил (например, 2-птеридинил), карбазолил (например, 2-карбазолил, 4-карбазолил), фенантридинил (например, 2-фенантридинил, 3-фенантридинил), акридинил (например, 1-акридинил, 2-акридинил), дибензофуранил (например, 1-дибензофуранил, 2-дибензофуранил), бензоимидазолил (например, 2-бензоимидазолил), бензоизоксазолил (например, 3-бензоизоксазолил), бензооксазолил (например, 2-бензооксазолил), бензооксадиазолил (например, 4-бензооксадиазолил), бензоизотиазолил (например, 3-бензоизотиазолил), бензотиазолил (например, 2-бензотиазолил), бензофурил (например, 3-бензофурил), бензотиенил (например, 2-бензотиенил), дибензотиенил (например, 2-дибензотиенил) и бензодиоксолил (например, 1,3-бензодиоксолил) и т.д.

Термин "арилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "арилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают фенилокси и нафтилокси и т.д.

Термин "арилтио" включает группу, в которой атом серы замещен одним "арилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают фенилтио и нафтилтио и т.д.

Термин "арилсульфинил" включает группу, в которой сульфенил замещен одним "арилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают фенилсульфинил и нафтилсульфинил и т.д.

Термин "арилсульфонил" включает группу, в которой сульфонил замещен одним "арилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают фенилсульфонил и нафтилсульфонил и т.д.

Примеры "арилсульфонилокси" включают фенилсульфонилокси и нафтилсульфонилокси и т.д.

Термин "арилоксикарбонил" включает группу, в которой карбонил замещен одним "арилокси", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают фенилоксикарбонил, 1-нафтилоксикарбонил и 2-нафтилоксикарбонил и т.д.

Термин "гетероарилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "гетероарилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают пирролилокси, фурилокси, тиенилокси, имидазолилокси, пиразолилокси, изотиазолилокси, изоксазолилокси, оксазолилокси, тиазолилокси, пиридилокси, пиразинилокси, пиримидинилокси, пиридазинилокси, тетразолилокси, оксадиазолилокси, тиадиазолилокси, индолидинилокси, изоиндолинилокси, индолилокси, индазолилокси, пуринилокси, хинолидинилокси, изохинолилокси, хинолилокси, фтаразинилокси, нафтилидинилокси, хиноланилокси,

хиназолинилокси, циннолинилокси, птеридинилокси, карбазолилокси, фенантридинилокси, акридинилокси, дибензофуранилокси, бензоимидазолилокси, бензоизоксазолилокси, бензооксазолилокси, бензооксадиазолилокси, бензоизотиазолилокси, бензотиазолилокси, бензофурилокси, бензотиенилокси, дибензотиенилокси и бензодиоксолилокси. Предпочтительно фурилокси, тиенилокси, имидазолилокси, пиразолилокси, изотиазолилокси, изоксазолилокси, оксазолилокси, тиазолилокси, пиридилокси, пирази-нилокси, пиримидинилокси и пиридазинилокси и т.д.

Термин "гетероарилтио" включает группу, в которой атом серы замещен одним "гетероарилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают пирролилтио, фурилтио, тиенилтио, имидазолил-тио, пиразолилтио, изотиазолилтио, изоксазолилтио, оксазолилтио, тиазолилтио, пиридилтио, пирази-нилтио, пиримидинилтио, пиридазинилтио, тетразолилтио, оксадиазолилтио, тиадиазолилтио, индоли-динилтио, изоиндолинилтио, индолилтио, индазолилтио, пуринилтио, хинолидинилтио, изохинолилтио, хинолилтио, фтаразинилтио, нафтилидинилтио, хиноланилтио, хиназолинилтио, циннолинилтио, птери-динилтио, карбазолилтио, фенантридинилтио, акридинилтио, дибензофуранилтио, бензоимидазолилтио, бензоизоксазолилтио, бензооксазолилтио, бензооксадиазолилтио, бензоизотиазолилтио, бензотиазолил-тио, бензофурилтио, бензотиенилтио, дибензотиенилтио и бензодиоксолилтио и т.д. Предпочтительно фурилтио, тиенилтио, имидазолилтио, пиразолилтио, изотиазолилтио, изоксазолилтио, оксазолилтио, тиазолилтио, пиридилтио, пиразинилтио, пиримидинилтио и пиридазинилтио и т.д.

Термин "гетероарилсульфинил" включает группу, в которой сульфинил замещен одним "гетероари-лом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают пирролилсульфинил, фурилсульфинил, тиенилсульфинил, имидазолсульфинил, пиразолилсульфинил, изотиазолсульфинил, изоксазолил-сульфинил, оксазолилсульфинил, тиазолсульфинил, пиридилсульфинил, пиразинилсульфинил, пири-мидинилсульфинил, пиридазинилсульфинил, тетразолилсульфинил, оксадиазолилсульфинил, тиадиазо-лилсульфинил, индолидинилсульфинил, изоиндолилсульфинил, индолилсульфинил, индазолилсульфи-нил, пуринилсульфинил, хинолидинилсульфинил, изохинолилсульфинил, хинолилсульфинил, фтарази-нилсульфинил, нафтилидинилсульфинил, хиноланилсульфинил, хиназолинилсульфинил, циннолинил-сульфинил, птеридинилсульфинил, карбазолилсульфинил, фенантридинилсульфинил, акридинилсуль-финил, дибензофуранилсульфинил, бензоимидазолсульфинил, бензоизоксазолилсульфинил, бензоок-сазолилсульфинил, бензооксадиазолилсульфинил, бензоизотиазолилсульфинил, бензотиазолилсульфи-нил, бензофурилсульфинил, бензотиенилсульфинил, дибензотиенилсульфинил и бензодиоксолилсуль-финил и т.д. Предпочтительно фурилсульфинил, тиенилсульфинил, имидазолсульфинил, пиразолил-сульфинил, изотиазолсульфинил, изоксазолилсульфинил, оксазолилсульфинил, тиазолсульфинил, пиридилсульфинил, пиразинилсульфинил, пиримидинилсульфинил и пиридазинилсульфинил и т.д.

Термин "гетероарилсульфонил" включает группу, в которой сульфонил замещен одним "гетероари-лом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают пирролилсульфонил, фурилсульфонил, тиенилсульфонил, имидазолсульфонил, пиразолилсульфонил, изотиазолсульфонил, изоксазолил-сульфонил, оксазолилсульфонил, тиазолсульфонил, пиридилсульфонил, пиразинилсульфонил, пири-мидинилсульфонил, пиридазинилсульфонил, тетразолилсульфонил, оксадиазолилсульфонил, тиадиазо-лилсульфонил, индолизинилсульфонил, изоиндолилсульфонил, индолилсульфонил, индазолсульфо-нил, пуринилсульфонил, хинолидинилсульфонил, изохинолилсульфонил, хинолилсульфонил, фтарази-нилсульфонил, нафтилидинилсульфонил, хиноланилсульфонил, хиназолинилсульфонил, циннолинил-сульфонил, птеридинилсульфонил, карбазолилсульфонил, фенантридинилсульфонил, акридинилсульфо-нил, дибензофуранилсульфонил, бензоимидазолсульфонил, бензоизоксазолилсульфонил, бензооксазо-лилсульфонил, бензооксадиазолилсульфонил, бензоизотиазолилсульфонил, бензотиазолилсульфонил, бензофурилсульфонил, бензотиенилсульфонил, дибензотиенилсульфонил и бензодиоксолилсульфонил и т.д. Фурилсульфонил, тиенилсульфонил, имидазолсульфонил, пиразолилсульфонил, изотиазолсуль-фонил, изоксазолилсульфонил, оксазолилсульфонил, тиазолсульфонил, пиридилсульфонил, пирази-нилсульфонил, пиримидинилсульфонил и пиридазинилсульфонил являются предпочтительными.

Термин "гетероарилсульфонилокси" включает группу, в которой атом кислорода замещен одним "гетероарилсульфонилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают пирролилсульфо-нилокси, фурилсульфонилокси, тиенилсульфонилокси, имидазолсульфонилокси, пиразолилсульфони-локси, изотиазолсульфонилокси, изоксазолилсульфонилокси, оксазолилсульфонилокси, тиазолил-сульфонилокси, пиридилсульфонилокси, пиразинилсульфонилокси, пиримидинилсульфонилокси, пири-дазинилсульфонилокси, тетразолилсульфонилокси, оксадиазолилсульфонилокси, тиадиазолилсульфо-нилокси, индолизинилсульфонилокси, изоиндолилсульфонилокси, индолилсульфонилокси, индазолил-сульфонилокси, пуринилсульфонилокси, хинолидинилсульфонилокси, изохинолилсульфонилокси, хино-лилсульфонилокси, фтаразинилсульфонилокси, нафтилидинилсульфонилокси, хиноланилсульфонилок-си, хиназолинилсульфонилокси, циннолинилсульфонилокси, птеридинилсульфонилокси, карбазолил-сульфонилокси, фенантридинилсульфонилокси, акридинилсульфонилокси, дибензофуранилсульфони-локси, бензоимидазолсульфонилокси, бензоизоксазолилсульфонилокси, бензооксазолилсульфонилок-си, бензооксадиазолилсульфонилокси, бензоизотиазолилсульфонилокси, бензотиазолилсульфонилокси, бензофурилсульфонилокси, бензотиенилсульфонилокси, дибензотиенилсульфонилокси и бензодиоксо-лилсульфонилокси и т.д. Предпочтительно, фурилсульфонилокси, тиенилсульфонилокси, имидазолил-

сульфонилокси, пирозолилсульфонилокси, изотиазолилсульфонилокси, изоксазолилсульфонилокси, оксазолилсульфонилокси, тиазолилсульфонилокси, пиридилсульфонилокси, пиразинилсульфонилокси, пиримидинилсульфонилокси и пиридазинилсульфонилокси и т.д.

Термин "ароматическое карбоциклическое кольцо" включает ароматическое моноциклическое или ароматическое конденсированное карбоциклическое кольцо. Примеры включают бензольное кольцо, нафталиновое кольцо и антраценовое кольцо. Бензольное кольцо является предпочтительным.

Термин "ароматическое гетероциклическое кольцо" включает ароматическое моноциклическое или ароматическое конденсированное гетероциклическое кольцо. Примеры включают пиррольное кольцо, фурановое кольцо, тиофеновое кольцо, пиразольное кольцо, имидазольное кольцо, изотиазольное кольцо, изоксазольное кольцо, оксазольное кольцо, тиазольное кольцо, пиразиновое кольцо, пиримидиновое кольцо, пиридазиновое кольцо, тетразольное кольцо, оксадиазольное кольцо, тиадиазольное кольцо, индолизиновое кольцо, изоиндольное кольцо, индольное кольцо, индазольное кольцо, пуриновое кольцо, хинолидиновое кольцо, изохинолиновое кольцо, хинолиновое кольцо, фтаразиновое кольцо, нафтиридиновое кольцо, хинолановое кольцо, хиназолиновое кольцо, циннолиновое кольцо, птеридиновое кольцо, карбазольное кольцо, фенантридиновое кольцо, акридиновое кольцо, дибензофурановое кольцо, бензоимидазольное кольцо, бензоизоксазольное кольцо, бензооксазольное кольцо, бензооксадиазольное кольцо, бензоизотиазольное кольцо, бензотиазольное кольцо, бензофурановое кольцо, бензотиофеновое кольцо, дибензотиофеновое кольцо и бензодиоксолановое кольцо. Пиридиновое кольцо, фурановое кольцо и тиофеновое кольцо являются предпочтительными.

Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен" включает линейную или разветвленную алкиленовую группу, содержащую от одного до шести атом(ов) углерода. Примеры включают -CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Предпочтительными являются -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

Термин "алкилен, необязательно содержащий один или два гетероатом(а)" или "необязательно замещенный алкилен, необязательно содержащий один или два гетероатом(а)" включает линейную или разветвленную алкиленовую группу, содержащую от одного до шести атомов углерода, необязательно содержащую один или два гетероатом(а), которые могут быть замещены "алкилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают -CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>O-, -OCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>S-, -SCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-, -SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, -OCH<sub>2</sub>O-, -NHCH<sub>2</sub>-, -N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- и -N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- и т.д. Предпочтительными являются -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, -OCH<sub>2</sub>O- и -N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

Термин "алкенилен, необязательно содержащий один или два гетероатом(а)" или "необязательно замещенный алкенилен, необязательно содержащий один или два гетероатом(а)" включает прямую или разветвленную алкениленовую группу, содержащую от двух до шести атомов углерода, необязательно содержащую один или два гетероатом(а), которые могут быть замещены "алкилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают -CH=CHCH=CH-, -CH=CHO-, -OCH=CH-, -CH=CHS-, -SCH=CH-, -CH=CHNH-, -NHCH=CH-, -CH=CH-CH=N- и -N=CH-CH=CH-. Предпочтительными являются -CH=CHCH=CH-, -CH=CHCH=N- и -N=CHCH=CH-.

Термин "алкинилен, необязательно содержащий один или два гетероатом(а)" включает линейную или разветвленную алкиниленовую группу, содержащую от двух до шести атомов углерода, необязательно содержащую один или два гетероатом(а), которые могут быть замещены "алкилом", как описано в настоящем изобретении. Примеры включают -C≡CCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>O-, -OCH<sub>2</sub>C≡CH-, -CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>S-, -SCH<sub>2</sub>C≡CH-, -CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>NH-, -NHCH<sub>2</sub>C≡CH-, -CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)- и -N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>C≡CH-. Наиболее предпочтительными являются -CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>- и -OCH<sub>2</sub>C≡CH-.

Термин "3-8-членное азотсодержащее неароматическое гетероциклическое кольцо" включает кольцо любой из формул, описанных как таковых в патенте США 8143285, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Термин "3-8-азотсодержащее ароматическое гетероциклическое кольцо" включает 3-8-членное ароматическое гетероциклическое кольцо, содержащее один или более атом(ов) азота и дополнительно необязательно атом кислорода и/или атом серы в кольце. Примеры включают пирролил (например, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил), имидазолил (например, 2-имидазолил, 4-имидазолил), пиразолил (например, 1-пиразолил, 3-пиразолил), изотиазолил (например, 3-изотиазолил), изоксазолил (например, 3-изоксазолил), оксазолил (например, 2-оксазолил), тиазолил (например, 2-тиазолил), пиридил (например, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил), пиразинил (например, 2-пиразинил), пиримидинил (например, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил), пиридазинил (например, 3-пиридазинил), тетразолил (например, 1H-тетразолил), оксадиазолил (например, 1,3,4-оксадиазолил) и тиадиазолил (например, 1,3,4-тиадиазолил).

Термин "4-8-членное азотсодержащее гетероциклическое кольцо, содержащее один или два атом(а) азота" означает кольцо любой из формул, описанных как таковых в патенте США 8143285, который пол-

ностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

"Необязательно замещенный" используется в настоящем описании взаимозаменяемо с "замещенным или незамещенным".

В настоящем описании примеры заместителей в "необязательно замещенном алкиле", "необязательно замещенном алкилокси", "необязательно замещенном алкилтио", "необязательно замещенном алкилсульфиниле", "необязательно замещенном алкилсульфониле", "необязательно замещенном алкилсульфонилокси" и "необязательно замещенном алкилоксикарбониле" включают циклоалкил, алкилен, необязательно содержащий один или два гетероатом(а), гидроксид, оксо, алкилокси, необязательно замещенный группой заместителей А в одном-трех положениях(ях), меркапто, алкилтио, атом галогена, нитро, циано, карбокси, алкилоксикарбонил, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный карбамоил, ацил, арил (например, фенил), необязательно замещенный группой заместителей В в одном-трех положениях(ях), гетероарил (например, пиридил, фурил, тиенил, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол), необязательно замещенный группой заместителей С в одном-трех положениях(ях), необязательно замещенную неароматическую гетероциклическую кольцевую группу (например, морфолин, пирролидин, пиперазин), которая может быть замещена группой заместителей С в одном-трех положениях(ях), арилокси (например, фенилокси), необязательно замещенный группой заместителей В в одном-трех положениях(ях), алкилсульфонил и подобные. Вышеупомянутые "необязательно замещенные" фрагменты могут быть замещены одним-тремя из вышеуказанных заместителя(ей) в любом возможном положении.

В настоящем описании примеры заместителей в "необязательно замещенном алкениле", "необязательно замещенном алкиниле", "необязательно замещенном алкенилокси", "необязательно замещенном алкинилокси", "необязательно замещенном алкенилтио", "необязательно замещенном алкинилтио", "необязательно замещенном алкенилоксикарбониле", "необязательно замещенном алкинилоксикарбониле", "необязательно замещенном циклоалкиле", "необязательно замещенном циклоалкениле", "необязательно замещенном циклоалкилокси", "необязательно замещенном циклоалкенилокси", "необязательно замещенном циклоалкилтио", "необязательно замещенном циклоалкенилтио", "необязательно замещенном циклоалкилсульфиниле", "необязательно замещенном циклоалкенилсульфиниле", "необязательно замещенном циклоалкилсульфониле", "необязательно замещенном циклоалкенилсульфониле", "необязательно замещенном циклоалкилсульфонилокси", "необязательно замещенном циклоалкенилсульфонилокси", "необязательно замещенном алкенилоксикарбониле", "необязательно замещенном алкилене", "необязательно замещенном C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилене", "необязательно замещенном алкилене, необязательно содержащем один или два гетероатом(а)", "необязательно замещенном алкенилене", "необязательно замещенном алкенилене, необязательно содержащем один или два гетероатом(а)", "необязательно замещенном алкинилене" и "необязательно замещенном алкинилене, необязательно содержащем один или два гетероатом(а)" включают алкил (такой как диалкил), необязательно замещенный группой заместителей D в одном-трех положениях(ях), циклоалкил, гидроксид, оксо, алкилокси, необязательно замещенный группой заместителей А в одном-трех положениях(ях), меркапто, алкилтио, атом галогена, нитро, циано, карбокси, алкилоксикарбонил, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный карбамоил, ацил, ацилокси, арил (например, фенил), необязательно замещенный группой заместителей В в одном-трех положениях(ях), гетероарил (например, пиридил, фурил, тиенил, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол), необязательно замещенный группой заместителей С в одном-трех положениях(ях), неароматическую гетероциклическую группу (например, морфолин, пирролидин, пиперазин), необязательно замещенную группу заместителей С в одном-трех положениях(ях), арилокси (например, фенилокси), необязательно замещенный группой заместителей С в одном-трех положениях(ях), алкилсульфонил и подобные. Вышеупомянутые "необязательно замещенные" фрагменты могут быть замещены одним или более из вышеуказанных заместителя(ей) в любом возможном положении.

В настоящем описании примеры заместителей в "необязательно замещенном ариле", "необязательно замещенном фенокси", "необязательно замещенном арилокси", "необязательно замещенном фенилтио", "необязательно замещенном арилтио", "необязательно замещенном арилсульфиниле", "необязательно замещенном арилсульфониле", "необязательно замещенном арилсульфонилокси", "необязательно замещенном гетероариле", "необязательно замещенном гетероарилокси", "необязательно замещенном гетероарилтио", "необязательно замещенном гетероарилсульфиниле", "необязательно замещенном гетероарилсульфонилокси", "необязательно замещенной неароматической гетероциклической группе", "необязательно замещенном пиперазин-1,4-дииле", "замещенном пиперазин-1,4-дииле", "необязательно замещенном C<sub>6</sub>-арен-1,4-диамин-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-дииле" и замещенном C<sub>6</sub>-арен-1,4-диамин-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-дииле" включают алкил, необязательно замещенный группой заместителей D в одном-трех положениях(ях), оксо, циклоалкил, алкенил, алкинил, гидроксид, алкилокси, необязательно замещенный группой заместителей А в одном-трех положениях(ях), арилокси (например, фенокси), необязательно замещенный группой заместителей В в одном-трех положениях(ях), меркапто, алкилтио, атом галогена, нитро, циано, карбокси, алкилоксикарбонил, ацил, алкилсульфонил, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный карбамоил, арил (например, фенил), необязательно замещенный группой заместителей В в одном-трех положениях(ях), гетероарил (например, пири-

дил, фурил, тиенил, имидазолил, оксазолил, тиазолил, пиразолил), необязательно замещенный группой заместителей С в одном-трех положении(ях), неароматическую гетероциклическую группу (например, морфолинил, пирролидинил, пиперазинил), необязательно замещенную группой заместителей С в одном-трех положении(ях), и подобные. Вышеупомянутые "необязательно замещенные" фрагменты могут быть замещены одним или более из вышеуказанных заместителя(ей) в любом возможном положении.

Группа заместителей А состоит из атома галогена и фенила, необязательно замещенного одним-тремя заместителем(ями), выбранными из группы заместителей В.

Группа заместителей В состоит из атома галогена, алкила, алкилокси, циано и нитро.

Группа заместителей С состоит из атома галогена и алкила.

Группа заместителей D состоит из атома галогена и алкилокси.

В соединениях, в которых R<sup>2</sup> представляет собой электронную пару, кислород заряжен отрицательно и может образовывать соль с катионом.

В некоторых соединениях R<sup>3</sup>, по меньшей мере, в 1, по меньшей мере, в 2, по меньшей мере, в 3 из A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> и A<sup>5</sup> представляет собой атом водорода или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил.

В ходе выполнения способов настоящего изобретения терапевтически эффективное количество соединений изобретения можно вводить животному, включая млекопитающих и людей, многими способами. Хотя в предпочтительном варианте осуществления соединения изобретения вводят перорально, парентерально или местно, также рассматриваются другие формы введения, такие как посредством медицинских соединений или аэрозолей.

Для перорального введения эффективное количество соединений можно вводить, например, в твердом, полутвердом, жидком или газообразном состоянии. Определенные примеры включают таблетку, капсулу, порошок, гранулу, раствор, суспензию, сироп и эликсир. Однако соединения не ограничиваются этими формами.

Чтобы составить соединения изобретения в таблетки, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии, соединение предпочтительно смешивают со связующим веществом, разрыхлителем и/или скользящим веществом. При необходимости полученная композиция может быть смешана с разбавителем, буфером, пропитывающим агентом, консервантом и/или ароматизатором, используя известные способы. Примеры связующего вещества включают кристаллическую целлюлозу, производные целлюлозы, кукурузный крахмал, циклодекстрины и желатин. Примеры разрыхлителя включают кукурузный крахмал, картофельный крахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Примеры скользящего вещества включают тальк и стеарат магния. Кроме того, также могут использоваться вспомогательные вещества, которые обычно применялись, такие как лактоза и маннит.

Для парентерального введения соединения настоящего изобретения можно вводить ректально или путем инъекции. Для ректального введения можно использовать суппозиторий. Суппозиторий можно приготовить путем смешивания соединений настоящего изобретения с фармацевтически подходящим эксципиентом, который плавится при температуре тела, но остается твердым при комнатной температуре. Примеры включают, но не ограничиваются ими, масло какао, углеродный воск и полиэтиленгликоль. Полученной композиции можно придать любую желаемую форму с использованием способов, известных в данной области техники.

Для введения путем инъекции соединения настоящего изобретения можно вводить подкожно, внутривенно, внутримышечно. Лекарственные препараты для такой инъекции могут быть приготовлены растворением, суспендированием или эмульгированием соединений изобретения в водном или неводном растворителе, таком как растительное масло, глицерид синтетической смоляной кислоты, сложный эфир высшей жирной кислоты или пропиленгликоль с помощью известного способа. При желании также могут быть добавлены вспомогательные вещества, такие как солюбилизующий агент, осморегулирующий агент, эмульгатор, стабилизатор или консервант, которые обычно использовались. Хотя это и не требуется, предпочтительно, чтобы композиция была стерильной или стерилизованной.

Чтобы составить соединения изобретения в виде суспензий, сиропов или эликсиров, можно использовать фармацевтически подходящий растворитель. Среди них включен неограничивающий пример воды.

Для местного введения составы для местного применения могут быть в форме геля, крема, лосьона, жидкости, эмульсии, мази, спрея, раствора, суспензии и пластырей. Неактивные ингредиенты в составах для местного применения, например, включают, но не ограничиваются ими, лауриллат (смягчающее вещество/усилитель проницаемости), моноэтиловый эфир диэтиленгликоля (смягчающее вещество/усилитель проницаемости), ДМСО (усилитель растворимости), силиконовый эластомер (модификатор реологии/текстуры), каприловый/каприновый триглицерид (смягчающее вещество), октисалат (смягчающее вещество/УФ-фильтр), силиконовая жидкость (смягчающее вещество/разбавитель), сквален (смягчающее вещество), подсолнечное масло (смягчающее вещество) и диоксид кремния (загуститель).

Соединения изобретения также можно использовать вместе с дополнительным соединением, обладающим другой фармацевтически подходящей активностью, для получения лекарственного препарата. Лекарственным средством, содержащим соединение изобретения или как отдельное соединение, или как часть композиции, можно использовать для лечения объектов, нуждающихся в таком лечении.

Соединения изобретения также можно вводить в форме аэрозоля или ингалятора, полученного путем загрузки соединений в форме жидкости или мелкого порошка вместе с газообразным или жидким распыляющим агентом и при необходимости известным вспомогательным средством, таким как газообразующий агент, в контейнер без давления, такой как аэрозольный контейнер или небулайзер. В качестве распыляющего агента можно использовать сжатый газ, например, дихлорфторметан, пропан или азот.

Соединения изобретения можно вводить животным, включая млекопитающих и людей, при их необходимости в виде фармацевтической композиции, такой как таблетки, капсулы, растворы или эмульсии. Введение других форм соединений, описанных в данном изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, их сложные эфиры, их фармацевтически приемлемые соли, их метаболиты, их структурно родственные соединения, их аналоги и их комбинации, в однократной дозе или множественной дозе, также предусмотрено настоящим изобретением.

Соединения изобретения также можно вводить животному, нуждающемуся в таком лечении, в качестве пищевой добавки или в виде пищи, или в виденутрицевтической добавки.

Термины "предотвращение", "лечение" или "улучшение" и аналогичные термины, используемые в настоящем описании, включают профилактику и полное или частичное лечение. Термины могут также включать уменьшение симптомов, улучшение симптомов, уменьшение степени тяжести симптомов, снижение частоты возникновения заболевания или любое другое изменение состояния пациента, которое улучшает терапевтический эффект.

Соединения, описанные в данном изобретении, предпочтительно используются и/или вводятся в форме композиции. Подходящие композиции предпочтительно представляют собой фармацевтическую композицию, пищевой продукт или пищевую добавку. Данные композиции предоставляют удобную форму для доставки соединений. Композиции изобретения могут содержать антиоксидант в количестве, эффективном для повышения стабильности соединений в отношении окисления или растворимости.

Количество соединения, которое вводят в способе изобретения или которое предназначено для введения при применении изобретения, представляет собой любое подходящее количество. Предпочтительно оно составляет от 1 нг/кг массы тела до 20 г/кг массы тела, более предпочтительно в диапазоне от 1 мкг/кг массы тела до 1 г/кг массы тела, например, от 1 мг/кг массы тела до 100 мг/кг массы тела соединения в день. Соответственно могут быть составлены подходящие композиции. Специалисты в области дозирования биологически активных агентов смогут разработать конкретные режимы дозирования для различных объектов на основе известных и хорошо изученных параметров.

Предпочтительная композиция в соответствии с изобретением представляет собой фармацевтическую композицию, например, в форме таблеток, пилюль, капсул, каплет, множества частиц (включая гранулы, шарики, пеллеты и микроинкапсулированные частицы), порошков, эликсиров, сиропов, суспензий и растворов. Фармацевтические композиции обычно содержат фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Фармацевтические композиции предпочтительно адаптированы для парентерального или перорального введения. Композиции для перорального введения могут быть в твердой или жидкой форме и могут принимать форму таблеток, порошков, суспензий и сиропов, среди прочего. Необязательно композиции содержат один или более ароматизаторов и/или красителей. В общем, терапевтические и пищевые композиции могут содержать любое вещество, которое не оказывает значительного влияния на действие соединений на объект.

Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для применения в таких композициях, хорошо известны в области фармацевтики. Композиции изобретения могут содержать 0,01-99 мас.% соединений изобретения. Композиции изобретения обычно готовят в виде стандартной лекарственной формы. Предпочтительно стандартная дозировка соединений, описанных в настоящем изобретении, составляет от 0,1 до 2000 мг, более предпочтительно от 50 до 1000 мг. Эксципиенты, используемые при приготовлении этих композиций, представляют собой эксципиенты, известные в данной области техники.

Дополнительными примерами форм продукта для композиции являются пищевые добавки, например, в форме мягкого геля или твердой капсулы, содержащие инкапсулирующий материал, выбранный из группы, состоящей из желатина, крахмала, модифицированного крахмала, производных крахмала, таких как глюкоза, сахароза, лактоза и фруктоза. Инкапсулирующий материал может необязательно содержать сшивающие или полимеризующие агенты, стабилизаторы, антиоксиданты, светопоглощающие агенты для защиты светочувствительных наполнителей, консерванты и подобное. Предпочтительно стандартная дозировка соединений, описанных в настоящем изобретении, составляет от 0,1 до 2000 мг, более предпочтительно от 50 до 1000 мг.

В общем, термин "носитель" может использоваться в данном изобретении для обозначения композиции, с которой могут быть смешаны описанные соединения, будь то фармацевтический носитель, пищевой продукт, пищевая добавка или диетическая добавка. Вышеописанные материалы могут рассматриваться как носители в целях изобретения. В определенных вариантах осуществления изобретения носитель практически не проявляет биологической активности в отношении соединений изобретения.

Доза: способы настоящего изобретения могут включать введение терапевтически эффективного количества соединения животному, нуждающемуся в таком лечении. Эффективное количество соединения зависит от формы вводимого соединения, продолжительности введения, пути введения (например, перо-



рально или парентерально), возраста животного и состояния животного, включая млекопитающих и людей.

Например, количество соединения, эффективное для лечения или профилактики диабета 1 типа, волчанки, язвенного колита, болезни Крона, желудочно-кишечного воспаления или любого другого состояния, описанного в настоящей заявке, у животного может находиться в диапазоне от 1 нг/кг/день до 20 г/кг/день. Предпочтительное эффективное количество соединения составляет от 50 мкг/кг/день до 5 г/кг/день с более предпочтительной дозой от 1 до 100 мг/кг/день. Эффективное количество соединения наиболее эффективно при лечении или профилактике диабета 1 типа, волчанки, язвенного колита, болезни Крона, желудочно-кишечного воспаления или любого другого состояния животного, описанного в настоящей заявке, при введении животному в течение периодов в диапазоне от приблизительно 1 до 1000 дней, с предпочтительным периодом от 7 до 300 дней и наиболее предпочтительным периодом от 30 до 90 дней, при этом наиболее эффективным определяется идентификация индукции положительных ответов. Эффективное количество соединения можно продолжать после этих периодов для поддержания положительных ответов при хронических заболеваниях.

Количество соединения, наиболее эффективное для предотвращения чрезмерной активации иммунной системы, может находиться в диапазоне от 1 нг/кг/день до 20 г/кг/день с предпочтительной дозой от 1 до 100 мг/кг/день.

Когда эффективное количество соединения настоящего изобретения вводят в составе пищевой, терапевтической, медицинской или ветеринарной композиции, предпочтительная доза находится в диапазоне от приблизительно 0,01 до 2,0% мас./мас. по отношению к пищевому или нутрицевтическому продукту.

В определенных других вариантах осуществления настоящее изобретение предоставляет применение соединений, описанных в настоящем изобретении, для лечения и профилактики диабета 1 типа, волчанки, ВЗК и воспаления желудочно-кишечного тракта.

Кроме того, в целом, настоящее изобретение относится к ингибированию или активации воспаления системно, причем соответствующие компоненты включают поджелудочную железу, селезенку, легкое, сердце, центральную нервную систему, суставы, печень, почки или желудочно-кишечный тракт, при этом соответствующие компоненты включают пищевод, желудок, тонкий кишечник, слепую кишку, толстую кишку и прямую кишку. Эффект возникает в результате воздействия соединения на различные типы клеток в организме, что вызывает биологический эффект. Клетки могут включать клетки тканей желудочно-кишечного тракта, иммунные клетки (т.е. макрофаги, моноциты, лимфоциты), клетки панкреатических островков, эндотелиальные клетки, нейроны или эпителиальные клетки. В определенных вариантах осуществления изобретение предоставляет лечение объектов соединением изобретения, например, в качестве пищевой добавки для уменьшения или предотвращения воспаления, связанного с диабетом 1 типа, волчанкой, или воспалительным заболеванием кишечника, или болезнью Крона, или язвенным колитом.

На практике способы изобретения могут представлять собой путь введения соединений объекту любым приемлемым путем введения с использованием любой приемлемой формы, как описано выше, и позволяя организму объекта распределять соединения в клетку-мишень через естественные процессы. Как описано выше, введение также может осуществляться путем прямой инъекции в участок (например, орган, ткань), содержащий клетку-мишень (т.е. клетку, подлежащую лечению).

Кроме того, введение можно проводить по любому количеству схем лечения. Таким образом, оно может включать однократную дозу или дозировку экспериментального соединения или множество доз или дозровок в течение периода времени. Соответственно, лечение может включать повторение стадии введения один или более раз до достижения желаемого результата. В определенных вариантах осуществления лечение может продолжаться в течение продолжительных периодов времени, например, недель, месяцев или лет. Режимы дозирования могут предпочтительно включать введение соединения от 6 раз в день до одного раза в неделю, с более предпочтительным режимом от трех раз в день до одного раза в день. Специалист в данной области техники полностью способен легко разработать подходящие режимы дозирования для пациентов на основе параметров, известных в данной области техники. Количества дозровок для соединений изобретения можно использовать в способах этих вариантов осуществления изобретения. Для лечения диабета 1 типа, волчанки или ВЗК предпочтительно вводить соединения в количествах от приблизительно 10 нг/день до 10 г/день.

Вводимое количество будет варьироваться в зависимости от объекта, стадии заболевания или нарушения, возраста объекта, общего состояния здоровья объекта и различных других параметров, известных и обычно принимаемых во внимание специалистом в области медицины. Как правило, вводят достаточное количество соединения, чтобы вызвать заметное изменение степени воспаления в поджелудочной железе, желудочно-кишечном тракте или системно. Уменьшение воспаления может быть связано с количеством боли, испытываемой объектом, инсулина, антител к ядерному антигену, уровнями ФНО $\alpha$  или С-реактивного белка в крови, процентом регуляторных Т-клеток в крови или концентрацией кальпротектина в кале. Подходящие количества раскрыты в настоящем описании, и дополнительные подходящие количества могут быть определены специалистом в данной области техники без излишнего или чрезмерно-

го экспериментирования на основе количеств, раскрытых в настоящем описании.

Должно быть очевидно, что настоящее изобретение предоставляет терапию соединением, связывающим LANCL2, для применения в контактирующих клетках, например, при лечении клеток объекта. Вышеупомянутое обсуждение сосредоточено на применении соединений настоящего изобретения как части композиции для применения в том, что обычно можно рассматривать как фармацевтическое или медицинское учреждение.

Соединения, описанные в данном изобретении для лечения аутоиммунного заболевания, включая диабет 1 типа, системную красную волчанку, ВЗК, синдром Шегрена и другие состояния, описанные в настоящей заявке, могут быть составлены в виде фармацевтической, питательной композиции, функциональной пищевой композиции или диетической добавки, как более подробно описано выше.

В качестве альтернативы или в дополнение к способам лечения состояний путем прямого введения соединений, состояний можно лечить с помощью подготовленных клеток, полученных из клеток-предшественников с соединениями.

Термин "клетка-предшественник" используется в настоящем описании для обозначения в целом любой клетки, которая служит исходной клеткой, которую обрабатывают для образования подготовленной клетки. Клетка может быть клеткой выше в линии дифференцировки, приводя к подготовленной клетке, такой как стволовая клетка, прогениторная клетка или "клетка-предшественник" (как термин используется в данной области техники для обозначения промежуточного звена между стволовой клеткой и дифференцированной клеткой), например, с тотипотентными, мультипотентными или унипотентными свойствами, но необязательно должна быть таковой. Соответственно, в некоторых вариантах создание подготовленной клетки из клетки-предшественника включает дифференцировку клетки-предшественника в подготовленную клетку. В других вариантах создание подготовленной клетки из клетки-предшественника просто включает индукцию изменений, таких как изменения экспрессии генов.

Подготовленные клетки могут быть получены из клеток-предшественников путем взаимодействия клеток-предшественников *in vitro* с одним или более соединениями изобретения, чтобы таким образом получить подготовленные клетки. Термины "*in vitro*" и "*ex vivo*" используются в настоящем описании взаимозаменяемо в отличие от "*in vivo*" и относятся к состоянию нахождения вне живого организма.

Предшественники и/или подготовленные клетки изобретения могут включать иммунные клетки. Примеры иммунных клеток включают гранулоциты, тучные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры, Т-клетки и В-клетки, среди прочего. Примеры гранулоцитов включают базофилы, эозинофилы и нейтрофилы.

Предшественники и/или подготовленные клетки изобретения могут включать белые кровяные тельца (лейкоциты). Примеры лейкоцитов включают нейтрофилы, эозинофилы (ацидофилы), базофилы, лимфоциты и моноциты.

Предшественники и/или подготовленные клетки изобретения могут включать моноклеарные клетки периферической крови (PBMCs) или моноклеарные клетки собственной пластинки (LPMCs). Примеры PBMCs и LPMCs включают лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки) и моноциты.

Предшественники и/или подготовленные клетки изобретения могут включать Т-клетки. Т-клетки делятся на две широкие категории: CD8+ Т-клетки или CD4+ Т-клетки в зависимости от того, какой белок присутствует на поверхности клетки. Т-клетки выполняют множество функций, включая уничтожение инфицированных клеток и активацию или рекрутирование других иммунных клеток. CD8+ Т-клетки также называются цитотоксическими Т-клетками или цитотоксическими лимфоцитами (ЦТЛ). Они имеют решающее значение для распознавания и удаления инфицированных вирусом клеток и раковых клеток. Основными подмножествами CD4+ Т-клеток являются наивные CD4+ Т-клетки, TH1-клетки, TH2-клетки, TH17-клетки и Treg-клетки, где "ТН" относится к "Т-хелперным клеткам". Наивные CD4+ Т-клетки представляют собой Т-клетки, которые не дифференцируются ни в одну из TH1-клеток, TH2-клеток, TH17-клеток и Treg-клеток. Регуляторные Т-клетки (Tregs) контролируют и ингибируют активность других Т-клеток. Они предотвращают неблагоприятную активацию иммунной системы и поддерживают толерантность или предотвращают иммунные реакции против собственных клеток организма и антигенов. В некоторых вариантах клетки-предшественники включают наивные CD4+ Т-клетки и подготовленные клетки включают Treg-клетки.

Получение подготовленных клеток из клеток-предшественников может включать взаимодействие количества одного или более соединений изобретения в течение времени, эффективного для индукции зависимого от соединения различия в подготовленных клетках по сравнению с клетками-предшественниками. Используемый в настоящем описании термин "зависимое от соединения различие" относится к различию между подготовленной клеткой и клеткой-предшественника, возникающему в результате взаимодействия клетки-предшественника с одним или более соединениями изобретения. Зависимые от соединения различия могут быть определены путем взаимодействия клеток со средами в присутствии или в отсутствие одного или более соединений изобретения, при этом зависимые от соединения различия представляют собой характеристики, которые проявляются только для клеток, взаимодействующих со средами в присутствии одного или более соединений изобретения. Зависимые от соединения различия могут представлять собой различия не только по характеру, но также по степени.

Зависимое от соединения различие в подготовленных клетках может включать различие в экспрессии генов. Если явно не указано иначе, "экспрессия гена" используется в настоящем описании в широком смысле для обозначения любой или всей транскрипции или трансляции. Таким образом, различие в экспрессии генов может быть различием в продукции мРНК, различием в продукции белка или и тем, и другим. Если явно не указано иначе, ген, имеющий дифференциальную экспрессию, может быть идентифицирован в настоящем описании путем ссылки на белок, полученный из гена (например, FOXP3), или путем ссылки на сам ген (например, Lag3). В различных вариантах изобретения зависимые от соединения различия в экспрессии генов могут включать одно или более из увеличения экспрессии ИЛ-10 или его ортолога, увеличения экспрессии FOXP3 или его ортолога, снижения экспрессии ФНО $\alpha$  или его ортолога, снижения экспрессии ИФН $\gamma$  или его ортолога, снижения экспрессии Tbet или его ортолога, увеличения экспрессии Lag3 или его ортолога, увеличения экспрессии Socs2 или его ортолога, увеличения экспрессии Ifi7 или его ортолога, увеличения экспрессии P2rx7 или его ортолога, увеличения экспрессии Carpi3 или его ортолога, увеличения экспрессии Ikzf2 или его ортолога, увеличения экспрессии Stat5a или его ортолога, увеличения экспрессии Pten или его ортолога, увеличения экспрессии Foxo1 или его ортолога и/или увеличения экспрессии Phlpp1 или его ортолога. Ортологи могут включать ортологи у видов животных. Ортологи могут включать ортологи у видов млекопитающих. Ортологи (например, для названных выше генов мыши) могут включать ортологи у приматов. Ортологи (например, для названных выше генов мыши) могут включать ортологи у людей.

Зависимое от соединения различие в подготовленных клетках может включать другие обнаруживаемые различия, такие как увеличение фосфорилирования STAT5a или его ортолога, увеличение фосфорилирования FOXO1 или его ортолога и/или повышение активности пируваткиназы.

При получении подготовленных клеток клетки-предшественники могут взаимодействовать с количествами соединения от приблизительно 100 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ или менее до приблизительно 1 мкМ, приблизительно 10 мкМ, приблизительно 100 мкМ, приблизительно 1 мМ или более. Клетки-предшественники могут взаимодействовать с соединением в течение времени от приблизительно 12 ч, 6 ч, 1 ч, приблизительно 30 мин или менее до приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч, приблизительно 72 ч или более.

В некоторых вариантах PBMCs или LPMCs в полном объеме взаимодействуют с соединением изобретения. PBMCs или LPMCs могут быть выделены от животного. В некоторых вариантах подтипы PBMCs или LPMCs, такие как Т-клетки, можно выделить из PBMCs или LPMCs и затем ввести во взаимодействие с соединением изобретения. В некоторых вариантах PBMCs или LPMCs взаимодействуют с соединением изобретения и затем из них выделяют подтипы клеток, такие как Т-клетки или конкретный тип Т-клеток. Способы выделения PBMCs, LPMCs и их подтипов известны в данной области техники. См., например, Majowicz et al. 2012 (Majowicz A, van der Marel S, te Velde AA, Meijer SL, Petry H, van Deventer SJ, Ferreira V. Murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells activated in vitro with PMA/ionomycin and anti-CD3 acquire regulatory function and ameliorate experimental colitis in vivo. *BMC Gastroenterol.* 2012 Dec 3; 12:172) and Canavan et al. 20016 (Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, Marks E, Stolarczyk E, Lo JW, Powell N, Fazekasova H, Irving PM, Sanderson JD, Howard JK, Yagel S, Afzali B, MacDonald TT, Hernandez-Fuentes MP, Shpigel NY, Lombardi G, Lord GM. Developing in vitro expanded CD45RA<sup>+</sup> regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut.* 2016 Apr; 65(4):584-94). Подмножества PBMCs, например, можно выделить с помощью анти-CD3 антител и анти-CD28 антител. Анти-CD3 антитела и анти-CD28 антитела могут быть предоставлены в форме анти-CD3/анти-CD28 гранул, таких как человеческий Т-активатор CD3/CD28 DYNABEADS® от ThermoFisher Scientific (Waltham, MA).

Получение подготовленных клеток может включать дифференцировку подготовленных клеток от клеток-предшественников. Например, подготовленные клетки, такие как Treg-клетки, можно дифференцировать от клеток-предшественников, таких как наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Такая дифференцировка может включать взаимодействие клеток-предшественников с факторами дифференцировки в дополнение к одному или более соединениям изобретения. Различные факторы дифференцировки могут включать полностью транс-ретиноевую кислоту, TFP- $\beta$ , форболмиристатацетат, иономицин, рапамицин и/или ИЛ-2. В некоторых вариантах дифференцировка может включать увеличение доли Treg-клеток в подготовленных клетках по сравнению с частью в клетках-предшественниках.

Предшественники и подготовленные клетки изобретения могут быть выделенными клетками. Термин "выделенный" или "очищенный" означает материал, который удаляют из своей исходной среды, например, из естественной среды. Материал называется "очищенным", когда он присутствует в определенной композиции в более высокой или более низкой концентрации, чем концентрация, которая существует до стадии(й) очистки.

Лечение состоянием подготовленными клетками изобретения может включать введение клеток животному в количестве, достаточном для лечения состояния. Подготовленные клетки можно вводить с использованием любого пути или способа, описанного выше для соединений, включая парентерально или энтерально. Неограничивающие формы парентерального введения включают инъекцию или инфу-

зию. Подготовленные клетки можно инъектировать или вводить непосредственно в кровоток или другие части тела. Неограничивающие формы энтерального введения включают пероральное и ректальное введение, так что подготовленные клетки попадают в желудочно-кишечный тракт. Подготовленные клетки могут быть аутологичными по отношению к животному, подлежащему лечению (т.е. полученными из клетки, взятой от того же животного, для лечения которого используется подготовленная клетка), или гетерологичными по отношению к животному, подлежащему лечению (т.е. полученными от другого животного, для лечения которого используется подготовленная клетка). Клетка, полученная, как описано выше, может быть использована в способе лечения любого из состояний, описанных в настоящем изобретении. Примеры состояний включают воспаление кишечника. Примеры типов воспаления кишечника включают воспалительное заболевание кишечника. Примерные типы воспалительного заболевания кишечника включают болезнь Крона и язвенный колит.

В одном варианте осуществления изобретения способ лечения иммунометаболического заболевания включает лечение, не вызывающее заметных побочных эффектов, таких как значительное увеличение веса, системное подавление иммунитета, кушингоидная внешность, остеопения/остеопороз, клеточная токсичность или панкреатит, которые являются обычными для доступных в настоящее время методов лечения (т.е. статины, антибиотики, кортикостероиды, доксорубицин, метотрексат). Другими словами, было обнаружено, что способ лечения в соответствии с настоящим изобретением, который предоставляет лечебный эффект, по меньшей мере, частично, путем воздействия на экспрессию и/или активацию LANCL2 и/или других иммунометаболических путей в некоторых клетках, предоставляет положительный эффект, не вызывающий значительного увеличения веса, например, вследствие задержки жидкости, у объекта, которого лечат, по сравнению с другими подобными объектами, не получающими лечение.

По существу, иммунометаболические способы настоящего изобретения могут предоставлять лечение для уменьшения воспаления путем воздействия на метаболизм иммунных клеток. Способы могут уменьшить воспаление системно (т.е. во всем теле объекта) или локально (например, в месте введения или в месте появления воспалительных клеток, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клетки и макрофаги). При лечении или профилактике воспаления посредством иммунометаболизма один эффект, который можно наблюдать, представляет собой сдвиг метаболизма глюкозы. В частности, сдвиг может происходить от получения лактата из пирувата к входу в цикл трикарбоновых кислот, который связан с иммуновоспалительными действиями. Более конкретно, этот сдвиг в метаболизме может быть связан с увеличением доли CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> или других регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с эффекторными CD4<sup>+</sup> Т-клетками, такими как ИЛ17<sup>+</sup> Th17-клетки или ИФНγ<sup>+</sup> Th1-клетки. Другой наблюдаемый эффект может заключаться в снижении клеточной пролиферации в результате комбинации снижения анаэробного метаболизма и усиления путей иммунных контрольных точек. Другой эффект сдвигов метаболизма, запускаемых терапевтически, может заключаться в снижении экспрессии воспалительных хемокинов, таких как MCP-1, ИЛ-8 или CXCL9, в результате изменения обработки и хранения жирных кислот. Таким образом, способы можно также рассматривать как способы воздействия или изменения иммунного ответа объекта, которому назначается терапия, таким образом предотвращая воспаление, заболевание и патологию.

Изобретение предоставляет способы ингибирования воспаления в желудочно-кишечном тракте, при этом соответствующие компоненты включают желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник и прямую кишку.

Изобретение предоставляет способы лечения или предотвращения развития ВЗК у объекта, страдающего ВЗК, или иначе у здоровых людей, возможно, с генетической предрасположенностью к болезни Крона или язвенному колиту. Эти способы также могут включать лечение пациентов с ремиссивной формой ВЗК. В соответствии с изобретением термин "объект, страдающий ВЗК" используется для обозначения объекта (например, животного, человека), страдающего заболеванием или нарушением, проявляющим один или более клинических признаков, которые являются типичными для ВЗК. В общем, способ лечения или предотвращения в соответствии с этим аспектом изобретения включает введение объекту количества соединения или клеточной терапии, которая является эффективной для лечения или предотвращения одного или более симптомов или клинических проявлений ВЗК или для предотвращения развития такого симптома(ов) или проявления(й).

Таким образом, в соответствии со способами изобретения изобретение может предоставить способы лечения ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. Способы лечения могут быть профилактическими способами. В определенных вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. В других вариантах осуществления способ представляет собой способ предотвращения ВЗК. В вариантах осуществления способ представляет собой способ предотвращения активизации ремиссивной формы ВЗК. В еще других вариантах осуществления способ представляет собой способ улучшения состояния здоровья объекта, страдающего ВЗК, воспалением, связанным с кишечной инфекцией, и воспалением, связанным с аутоиммунными заболеваниями. Организмы, вызывающие желудочно-кишечные инфекции, включают, но не

ограничиваются ими, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, патогенный *Vibrios*, *Campylobacter jejuni*, *Yersina enterocolitica*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* и *Giardia lamblia*. Соответственно, в определенных вариантах осуществления изобретение предоставляет способ защиты здоровья, органов и/или тканей объекта, страдающего ВЗК, воспалением, связанным с кишечной инфекцией, и воспалением, связанным с аутоиммунными заболеваниями, или подверженного риску развития ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями.

В одном варианте осуществления изобретения способ лечения ВЗК включает лечение ВЗК, не вызывая заметных побочных эффектов, таких как значительное увеличение веса, системное подавление иммунитета, кушингоидная внешность, остеопения/остеопороз или панкреатит, которые являются обычными для доступных в настоящее время способов лечения ВЗК (т.е. кортикостероиды, ингибиторы фактора некроза опухоли альфа). Другими словами, было обнаружено, что способ лечения в соответствии с настоящим изобретением, который предоставляет лечебный эффект, по меньшей мере, частично, путем воздействия на экспрессию и/или активацию LANCL2 в некоторых клетках, предоставляет положительный эффект, не вызывая значительного увеличения веса, например, за счет задержки жидкости у объекта, которого лечат, по сравнению с другими подобными объектами, не получающими лечение.

По существу, способы настоящего изобретения могут предоставлять способы уменьшения воспаления. Способы могут уменьшить воспаление системно (т.е. во всем теле объекта) или локально (например, в месте введения или в месте появления воспалительных клеток, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клетки и макрофаги). При лечении или предотвращении воспаления в соответствии со способами настоящего изобретения один эффект, который можно увидеть, представляет собой уменьшение количества моноцитов или макрофагов и лимфоцитов крови, инфильтрирующих кишечник. Другим может быть увеличение популяций регуляторных иммунных клеток, таких как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки, или увеличение регуляторных свойств лимфоцитов или макрофагов (например, повышение уровня интерлейкина 4 (ИЛ-4) или ИЛ-10 или снижение ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6). Другим может быть снижение присутствия воспалительных генов и/или молекул адгезии. Таким образом, способы можно также рассматривать как способы воздействия или изменения иммунного ответа объекта, которому назначается терапия. У объекта может быть воспалительное заболевание кишечника или другое состояние, при котором иммуномодуляция Т-клеток или подавление молекул клеточной адгезии является желаемым результатом.

Изобретение также предоставляет способы лечения инфекционного заболевания соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры таких инфекционных заболеваний включают вирусные инфекции, бактериальные инфекции и грибковые инфекции.

Неограничивающие примеры вирусных инфекций включают инфекции, вызываемые вирусами семейства Adenoviridae, такими как аденовирус; вирусами семейства Herpesviridae, такими как простой герпес 1 типа, простой герпес 2 типа, вирус ветряной оспы, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус человека, вирус герпеса человека и тип 8; вирусами семейства Papillomaviridae, такими как вирус папилломы человека; вирусами семейства Polyomaviridae, такими как вирус ВК и вирус JC; вирусами семейства Rotaviridae, такими как натуральная оспа; вирусами семейства Herpadnaviridae, такими как вирус гепатита В; вирусами семейства Parvoviridae, такими как бокавирус человека и парвовирус В19; вирусами семейства Astroviridae, такими как астровирус человека; вирусами семейства Caliciviridae, такими как норовирус; вирусами семейства Picornaviridae, такими как вирус Коксаки, вирус гепатита А, полиовирус и риновирус; вирусами семейства Coronaviridae, такими как коронавирус; вирусами семейства Flaviviridae, такими как вирус гепатита С, вирус Зика, вирус желтой лихорадки, вирус денге и вирус Западного Нила, вирусами семейства Togaviridae, такими как вирус краснухи; вирусами семейства Hepadnaviridae, такими как вирус гепатита Е; вирусами семейства Retroviridae, такими как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); вирусами семейства Orthomyxoviridae, такими как вирус гриппа; вирусами семейства Arenaviridae, такими как вирус Гуанарито, вирус Хунин, вирус Ласса, вирус Мачупо и вирус Сабиа; вирусами семейства Bunyaviridae, такими как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки; вирусами семейства Filoviridae, такими как вирус Эбола и вирус Марбург; вирусами семейства Paramyxoviridae, такими как вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус Хендра и вирус Нипах; вирусами семейства Rhabdoviridae, такими как вирус бешенства; неназначенными вирусами, такими как вирус гепатита D; и вирусами семейства Reoviridae, такими как ротавирус, орбивирус, колтивирус и вирус Банна; среди прочего.

Неограничивающие примеры бактериальных инфекций включают инфекции, вызываемые бактериями, описанными выше, в дополнение к *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococ-*

cus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, Vibrio cholerae, Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis и другие виды из родов вышеупомянутых организмов.

Неограничивающие примеры грибковых инфекций включают инфекции, вызванные грибами рода *Aspergillus*, такими как *Aspergillus fumigatus*, которые вызывают аспергиллез; грибами рода *Blastomyces*, такими как *Blastomyces dermatitidis*, которые вызывают бластомикоз; грибами рода *Candida*, такими как *Candida albicans*, которые вызывают кандидоз; грибами рода *Coccidioides*, которые вызывают кокцидиоидомикоз (пустынная лихорадка); грибами рода *Cryptococcus*, такими как *Cryptococcus neoformans* и *Cryptococcus gattii*, которые вызывают криптококкоз; грибами-дерматофитами, которые вызывают стригущий лишай; грибами, которые вызывают грибковый кератит, такими как виды *Fusarium*, виды *Aspergillus* и виды *Candida*; грибами рода *Histoplasma*, такими как *Histoplasma capsulatum*, которые вызывают гистоплазмоз; грибами порядка *Mucorales*, которые вызывают мукормикоз; грибами рода *Saccharomyces*, такими как *Saccharomyces cerevisiae*; грибами рода *Pneumocystis*, такими как *Pneumocystis jirovecii*, которые вызывают пневмоцистную пневмонию; и грибами рода *Sporothrix*, такими как *Sporothrix schenckii*, которые вызывают споротрихоз.

Изобретение также предоставляет способы лечения гиперпролиферативных нарушений соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Гиперпролиферативные нарушения включают состояния, включающие неконтролируемый рост клеток, такие как рак или состояния, включающие рост опухолей, аденом или полипов. Неограничивающие примеры гиперпролиферативных нарушений включают колоректальный рак, семейный аденоматозный полипоз (САП), рак горла, рак щитовидной железы, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, печеночноклеточный рак, гастроинтестинальные стромальные опухоли, острый лимфобластный лейкоз, хронические миелолиферативные нарушения, гиперэозинофильный синдром, мастоцитоз, среди прочего.

Изобретение также предоставляет способы лечения врожденного нарушения обмена веществ с помощью соединений или клеток, описанных в настоящем изобретении. Неограничивающие примеры врожденного нарушения обмена веществ включают болезнь Вильсона, болезнь Андерсена или другие болезни накопления гликогена, цистинурию, болезнь Фабри, цитруллинемию II типа у взрослых, синдром Целвегера, разветленнопочечную кетонурию, синдром Леша-Найхана, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фанкони-Бикеля, болезнь Гирке, наследственную непереносимость фруктозы, фенилкетонурию, дефицит среднепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, среди прочего.

Изобретение также предоставляет способы лечения хронического иммунометаболического заболевания соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры хронических иммунометаболических заболеваний включают сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, заболевание периферических артерий, сердечно-легочную недостаточность, эндокардит, миокардит и гипертензию.

Изобретение также предоставляет способы лечения аутоиммунного заболевания, такого как воспалительное аутоиммунное заболевание, соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) (например, болезнь Крона и язвенный колит), волчанку, системную волчанку, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, псориаз, рассеянный склероз и аутоиммунные заболевания, вызванные иммунотерапией рака, среди прочего. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний, вызванных иммунотерапией рака, включают ревматические заболевания, вызванные иммунотерапией рака.

Изобретение также предоставляет способы лечения хронических воспалительных заболеваний соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры хронических воспалительных заболеваний включают метаболический синдром, ожирение, преддиабет, сердечно-сосудистое заболевание и диабет 2 типа, среди прочего.

Изобретение также предоставляет способы лечения воспалительных заболеваний, таких как острый дивертикулит толстой кишки, вызванное облучением воспаление желудочно-кишечного тракта и воспаление печени, включая, но не ограничиваясь ими, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры вызванного облучением воспаления желудочно-кишечного тракта включают лучевой проктит, лучевой энтерит и лучевой проктосигмоидит.

Изобретение также предоставляет способы лечения диабета соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке, включая диабет 1 типа, диабет 2 типа и другие типы диабета. Термин "диабет" или "сахарный диабет" используется для обозначения метаболических нарушений, при которых объект имеет высокий уровень сахара в крови (т.е. гипергликемию). Гипергликемические состояния имеют различную этиологию, например, поджелудочная железа не вырабатывает достаточно инсулина или клетки не реагируют на вырабатываемый инсулин. Существует несколько признанных подтипов диабета. Диабет 1 типа характеризуется полной неспособностью организма вырабатывать инсулин или неспособностью организма вырабатывать достаточное количество инсулина. Диабет 2 типа обычно возникает в ре-

зультате инсулинорезистентности, состояния, при котором клетки не могут правильно использовать инсулин. Диабет 2 типа иногда сопровождается дефицитом инсулина. Гестационный диабет возникает, когда у беременных женщин без предварительного диагноза диабета развивается гипергликемия. Менее распространенные формы диабета включают врожденный диабет (вследствие генетических дефектов, связанных с секрецией инсулина), диабет, связанный с муковисцидозом, стероидный диабет, вызванный высокими дозами глюкокортикоидов, и несколько форм моногенного диабета (включая диабет взрослого типа у молодых). Моногенный диабет включает несколько наследственных форм диабета, вызванных мутациями в одном аутосомно-доминантном гене (в отличие от более сложной полигенной этиологии, приводящей к гипергликемии).

Изобретение также предоставляет способы лечения хронической боли соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры заболеваний с хронической болью включают фибромиалгию, повреждение нервов, мигрени, боль в спине, боль в животе, среди прочего.

Изобретение также предоставляет способы лечения дополнительных состояний соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. К ним относятся хронические воспалительные заболевания, такие как хроническая гранулематозная болезнь, болезнь "трансплантат против хозяина" и периодический синдром, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли; истощение мышц, такое как боковой амиотрофический склероз, миодистрофия Дюшенна, сколиоз, и прогрессирующая мышечная атрофия; и другие.

В одном аспекте изобретение предоставляет способы лечения аутоиммунного воспалительного заболевания соединениями или клетками, описанными в настоящей заявке. Неограничивающие примеры аутоиммунных воспалительных заболеваний включают воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), системную красную волчанку, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, псориаз и рассеянный склероз, среди прочего.

Изобретение также предоставляет способ лечения или облегчения симптомов у объекта, у которого диагностирована системная красная волчанка, или предотвращения развития заболевания у объекта, генетически предрасположенного к системной красной волчанке. Симптомы и признаки волчанки, которые можно лечить с помощью изобретения, включают, но не ограничиваются ими, волчаночный нефрит, воспаление центральной нервной системы, головные боли, склерит, неврит зрительного нерва, лихорадку, артериосклероз, ишемическую болезнь сердца, боли в суставах и малярию сыпь. Изобретение также предоставляет способ лечения дополнительных форм волчанки, включая кожную волчанку (дискоидную), волчанку, вызванную лекарственными средствами, и неонатальную волчанку.

Состояния, которые можно лечить способами, описанными в настоящей заявке, включают любые состояния, описанные как подлежащие лечению с помощью BT-11 в любом из патента США 9556146, to Bassaganya-Riera et al.; патента США 9839635 to Bassaganya-Riera et al.; патента США 10028950 to Bassaganya-Riera et al.; патента США 10201538 to Bassaganya-Riera et al.; патента США 10493072 to Bassaganya-Riera et al.; патента США 10682349 to Bassaganya-Riera et al.; US 2019/0160100 A1 to Bassaganya-Riera et al.; Bissel P, Boes K, Hinckley J, Jortner BS, Magnin-Bissel G, Werre SR, Ehrich M, Carbo A, Philipson C, Hontecillas R, Philipson N, Gandour RD, Bassaganya-Riera J. Exploratory Studies With BT-11: A Proposed Orally Active Therapeutic for Crohn's Disease. *Int J Toxicol.* 2016 Sep; 35(5):521-9); and Carbo et al. 2016 (Carbo A, Gandour RD, Hontecillas R, Philipson N, Uren A, Bassaganya-Riera J. An N, N-Bis(benzimidazolylpicolinoyl)piperazine (BT-11): A Novel Lanthionine Synthetase C-Like 2-Based Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem.* 2016 Nov 23; 59(22):10113-10126); Leber et al. 2018 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Bassaganya-Riera J. Activation of LANCL2 by BT-11 Ameliorates IBD by Supporting Regulatory T Cell Stability Through Immunometabolic Mechanisms. *Inflamm Bowel Dis.* 2018 Aug 16; 24(9):1978-1991); Leber et al. 2019 *Int J Toxicol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Ehrich M, Davis J, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. Nonclinical Toxicology and Toxicokinetic Profile of an Oral Lanthionine Synthetase C-Like 2 (LANCL2) Agonist, BT-11. *Int J Toxicol.* 2019 Mar/Apr; 38(2):96-109); Leber et al. 2019 *J Immunol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. Oral Treatment with BT-11 Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Enhancing Regulatory T Cell Responses in the Gut. *J Immunol.* 2019 Apr 1; 202(7):2095-2104); and Leber et al. 2020 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Colombel JF, Chauhan J, Ehrich M, Farinola N, Bassaganya-Riera J. The Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics Profile of BT-11, an Oral, Gut-Restricted Lanthionine Synthetase C-Like 2 Agonist Investigational New Drug for Inflammatory Bowel Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase I Clinical Trial. *Inflamm Bowel Dis.* 2020 Mar 4; 26(4):643-652).

Элементы и стадии способа, описанные в настоящей заявке, могут использоваться в любой комбинации независимо от того, описаны они явно или нет.

Все комбинации стадий способа, используемые в настоящем описании, могут выполняться в любом порядке, если не указано иначе или явно не подразумевается обратным по контексту, на который ссылается комбинация.

Используемые в настоящем описании формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в содержании явно не указано иначе.

Используемые в настоящем описании числовые диапазоны предназначены для включения каждого

числа и подмножества чисел, содержащихся в этом диапазоне, независимо от того, раскрыты ли они конкретно или нет. Кроме того, эти числовые диапазоны следует рассматривать как поддержку утверждения, относящегося к любому числу или подмножеству чисел в данном диапазоне. Например, раскрытие от 1 до 10 следует толковать как поддержку диапазона от 2 до 8, от 3 до 7, от 5 до 6, от 1 до 9, от 3,6 до 4,6, от 3,5 до 9,9 и т.д.

Все патенты, патентные публикации и рецензируемые публикации (т.е. "ссылки"), цитируемые в настоящем описании, явно включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки. В случае противоречия между настоящим раскрытием и включенными ссылками настоящее раскрытие имеет преимущественную силу.

Очевидно, что изобретение не ограничивается определенной конструкцией и расположением частей, проиллюстрированных и описанных в настоящем изобретении, но охватывает такие его модифицированные формы, которые входят в объем формулы изобретения.

### Примеры

Молекулярное моделирование.

Пример 1. Молекулярное моделирование лигандов LANCL2.

Используя ранее описанные лиганды LANCL2, включая абсцизовую кислоту и NSC61610, авторы изобретения определили наличие основного связывающего кармана малых молекул на LANCL2. Данные лиганды были состыкованы с гомологичной модельной структурой LANCL2, основанной на кристаллической структуре гомолога близкого семейства LANCL1, для установления важных связывающих остатков.

Образование соединения. Из идентифицированных остатков и предсказанных биохимических взаимодействий были созданы структуры для лигандов LANCL2 с высокой аффинностью (фиг. 1). Структуры были созданы и химически оптимизированы с использованием WebMo. Файлы структуры были созданы в формате.pdb и преобразованы в формат.pdbqt путем расчета зарядов по методу Гастайгера. Структуры стыковали с использованием AutoDock Vina для подтверждения аффинности связывания в определенном кармане связывания с использованием кубовидной поисковой сетки размером (21 × 21 × 21 ангстрем), чтобы обеспечить предсказанные аффинности связывания и конформации лигандов. Аффинность связывания нормировали к молекулярной массе лиганда. Верхние лиганды отбирали для дальнейшего исследования позиции связывания.

Анализ. Соединения предварительно ранжировали по наименьшей предсказанной аффинности связывания, нормированной к молекулярной массе, представляя наиболее благоприятную позицию связывания за счет минимизации общей межмолекулярной энергии, полной внутренней энергии и свободной энергии кручения. Затем соединения были расставлены по приоритету на основе подходящих расстояний до критических связывающих остатков на LANCL2.

Результаты. На основании виртуального скрининга и полученных соединений (фиг. 1) ВТ-63, асимметричный пиперазин, содержащий небольшую молекулу, обеспечивал достаточную аффинность связывания, большую, чем предсказанная аффинность АВА (положительный контроль). В дополнение к связыванию ВТ-63 обеспечивал благоприятные характеристики перорального лекарственного средства и имел незначительные проблемы с безопасностью. Подобные молекулы в пределах небольшого хемотипа обеспечивали почти равную аффинность с небольшими модификациями химических свойств. К ним относятся ВТ-64, ВТ-65, ВТ-95, ВТ-96 и ВТ-99. Между тем изменения на противоположной стороне молекулы (ВТ-71, -72, -73, -74, -75) привели к аналогичным небольшим изменениям в аффинности связывания. Молекулярное моделирование этого семейства молекул подтверждает утверждение, что охватываемый хемотип обладает свойствами связывания LANCL2.

Медицинская химия.

Пример 2А. Синтез ВТ-63.

ВТ-63, 2-(4-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)пиперазин-1-ил)-1-фенилэтанон, можно синтезировать с помощью пятиступенчатого процесса. Порошок серы добавляли к смеси бензол-1,2-диамина и 2,6-диметилпиридина, затем нагревали до 160°C. Реакционную смесь разбавляли метанолом, отфильтровывали и испаряли при пониженном давлении с получением 2-(6-метилпиридин-2-ил)-1Н-бензо[d]имидазола. Диоксид селена добавляли к раствору 2-(6-метилпиридин-2-ил)-1Н-бензо[d]имидазола в пиридине и нагревали до 110°C. Растворитель из реакционной смеси испаряли при пониженном давлении и полученный неочищенный продукт экстрагировали этилацетатом. Высушенное твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиновой кислоты. ДИПЭА добавляли к раствору трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата и 2-бром-1-фенилэтанола в ДХМ при 0°C и перемешивали. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и органический слой отделяли с получением трет-бутил-4-(2-оксо-2-фенилэтил)пиперазин-1-карбоксилата. 4н. HCl в 1,4-диоксане добавляли к раствору трет-бутил-4-(2-оксо-2-фенилэтил)пиперазин-1-карбоксилата в ДХМ при 0°C и перемешивали при КТ. Растворитель испаряли с получением 1-фенил-2-(пиперазин-1-ил)этанола-HCl в виде белого с сероватым или желтоватым оттенком твердого вещества.



НАТУ добавляли к раствору 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиновой кислоты, 1-фенил-2-(пиперазин-1-ил)этанона-НСI и ДИПЭА в ДМФ и перемешивали. Реакционную смесь разбавляли и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой высушивали над сульфатом натрия и испаряли при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью системы очистки Grase на колонке с диоксидом кремния 40 мкм, используя метанол-дихлорметан в качестве элюента, с получением 2-(4-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)пиперазин-1-ил)-1-фенилэтанона. <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ 12,98 (с, 1Н), 8,37 (д, J=8,00 Гц, 1Н), 8,10 (т, J=8,00 Гц, 1Н), 7,99 (д, J=6,80 Гц, 2Н), 7,72 (д, J=8,40 Гц, 1Н), 7,65-7,48 (м, 5Н), 7,28-7,18 (м, 2Н), 3,95 (с, 2Н), 3,74 (т, J=4,80 Гц, 2Н), 3,45 (т, J=4,80 Гц, 2Н), 2,68 (т, J=4,80 Гц, 2Н), 2,55 (т, J=4,80 Гц, 2Н).

Пример 2В. Синтез ВТ-104-А.

ВТ-104-А, (2-(4-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)пиперазин-1-ил)-2-метил-1-фенилпропан-1-он, можно синтезировать через шестиступенчатый процесс.

Диметил-2,6-пиридинкарбоксилат перемешивали в метаноле и охлаждали до 10-20°C. К реакционной массе медленно добавляли гидроксид калия и перемешивали в течение 6 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением монометилового эфира 2,6-пиридиндикарбоновой кислоты.

Монометиловый эфир 2,6-пиридиндикарбоновой кислоты перемешивали в н-метилпирролидоне и охлаждали до 10-20°C. К реакционной смеси последовательно добавляли ДИПЭА, EDC.НСI и НОВt. После добавления растворителя добавляли бензол-1,2-диамин и перемешивали в течение 24 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением 6-(метоксикарбонил)пиридин-2-(2'-аминоацетанилида).

6-(Метоксикарбонил)пиридин-2-(2'-аминоацетанилид) перемешивали в уксусной кислоте в течение 15 мин. Реакционную массу нагревали до 60-65°C и перемешивали в течение 16 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)метилпиколината.

6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)метилпиколинат добавляли к гидроксиду лития в ТГФ/воде и перемешивали в течение 7 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиновой кислоты.

Метоксид натрия добавляли к раствору 2-бром-2-метил-1-фенилпропан-1-она в сухом метаноле и нагревали при 40°C в течение 4 ч. Неочищенный продукт помещали в толуол. Пиперазин добавляли к неочищенному продукту и нагревали с обратным холодильником в течение 16 ч. После завершения реакции растворитель испаряли при пониженном давлении с получением 2-метил-1-фенил-2-(пиперазин-1-ил)пропан-1-она.

6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиновую кислоту в ТЭА добавляли к раствору 2-метил-1-фенил-2-(пиперазин-1-ил)пропан-1-она в ТГФ и перемешивали в течение 10 мин. Добавляли ТЗР в этилацетате и перемешивали в течение 6 ч. После завершения реакции растворитель испаряли при пониженном давлении. Продукт очищали с получением (2-(4-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)пиперазин-1-ил)-2-метил-1-фенилпропан-1-она (ВТ-104-А). <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,34 (с, 1Н), 8,51 (д, J=8,0 Гц, 2Н), 8,45 (д, J=7,6 Гц, 1Н), 7,95 (т, J=8,0 Гц, 1Н), 7,85 (д, J=6,4 Гц, 1Н), 7,59 (д, J=6,4 Гц, 1Н), 7,57-7,50 (м, 2Н), 7,42 (т, J=7,6 Гц, 2Н), 7,35-7,30 (м, 2Н), 3,88 (уш.с, 2Н), 3,53 (т, J=4,80 Гц, 2Н), 2,77 (т, J=4,80 Гц, 2Н), 2,57 (т, J=4,80 Гц, 2Н), 1,37 (с, 6Н).

Пример 2С. Синтез ВТ-104-В.

ВТ-104-В, 4-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)-1-(2-оксо-2-фенилэтил)пиперазин-2,6-дион, можно синтезировать через шестиступенчатый процесс.

Диметил-2,6-пиридинкарбоксилат перемешивали в метаноле и охлаждали до 10-20°C. К реакционной массе медленно добавляли гидроксид калия и перемешивали в течение 6 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением монометилового эфира 2,6-пиридиндикарбоновой кислоты.

Монометиловый эфир 2,6-пиридиндикарбоновой кислоты перемешивали в н-метилпирролидоне и охлаждали до 10-20°C. К реакционной смеси последовательно добавляли ДИПЭА, EDC.НСI и НОВt. После добавления растворителя добавляли бензол-1,2-диамин и перемешивали в течение 24 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением 6-(метоксикарбонил)пиридин-2-(2'-аминоацетанилида).

6-(Метоксикарбонил)пиридин-2-(2'-аминоацетанилид) перемешивали в уксусной кислоте в течение 15 мин. Реакционную массу нагревали до 60-65°C и перемешивали в течение 16 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)метилпиколината.

6-(1Н-Бензо[d]имидазол-2-ил)метилпиколинат добавляли к гидроксиду лития в ТГФ/воде и перемешивали в течение 7 ч. После завершения реакции растворитель испаряли с получением 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиновой кислоты.

Пиперазин-2,6-дион в ТЭА добавляли к раствору 6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиновой кислоты в ТГФ и перемешивали в течение 10 мин. Затем добавляли ТЗР в этилацетате и перемешивали в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную смесь экстрагировали этилацетатом и промывали водой с получением 1-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)пиперазин-2,6-диона.

2-Бром-1-фенилэтан-1-он в ДИПЭА добавляли к раствору 1-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-

ил)пиколиноил)пиперазин-2,6-диона в сухом ДХМ:ДМФ и перемешивали в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную смесь экстрагировали этилацетатом и промывали водой. Материал высушивали и очищали с получением 4-(6-(1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)пиколиноил)-1-(2-оксо-2-фенилэтил)пиперазин-2,6-диона (BT-104-B). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 12,88 (с, 1H), 8,46 (д, J=7,60 Гц, 1H), 8,20 (т, J=8,00 Гц, 1H), 8,07 (д, J=8,00 Гц, 2H), 7,84 (д, J=7,60 Гц, 1H), 7,75-7,71 (м, 2H), 7,60-7,56 (м, 3H), 7,30-7,24 (м, 2H), 5,25 (с, 2H), 4,86 (д, J=4,40 Гц, 4H). Чистота по данным ВЭЖХ: 98,82%; МС: m/z 452,26 (М-Н).

Связывание с рецептором.

Пример 3. Связывание поверхностного плазмонного резонанса с LANCL2.

Введение.

Виртуальный скрининг и эксперименты *in silico* являются ценными средствами для выявления и определения приоритетов представляющих интерес каркасов при разработке новых низкомолекулярных лигандов для терапевтической мишени. Для подтверждения этих результатов существует множество способов *in vitro* для определения аффинности небольшой молекулы к белку, представляющему интерес. Одним из определенных способов является поверхностный плазмонный резонанс, который представляет собой способность оценивать связывание в равновесном состоянии путем пропускания суспензии лиганда над иммобилизованным очищенным белком. Этот способ был использован для оценки потенциальных лигандов LANCL2.

Способы.

Получение и очистка LANCL2. LANCL2 клонировали в *E. coli*, амплифицировали и трансфицировали в *Pichia pastoris*. *P. pastoris* высевали на аденин-селективную среду. Отбирали стабильные трансфицированные колонии и выращивали в бульоне YPD при 30°C в течение 24 ч, при встряхивании 240 об/мин. Стартовую культуру использовали для инокуляции базовой среды (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 1% сорбита, 2% основы азотного агара для дрожжей), содержащей биотин и содержащей буфер с фосфатом калия. Инокулированную основную среду инкубировали в течение 48 ч при 30°C, 240 об/мин. Затем *P. pastoris* осаждали центрифугированием и ресуспендировали в экспрессионной среде (1% сорбита, 2% основы азотного агара для дрожжей), содержащей биотин и содержащей буфер с фосфатом калия. Культуру индуцировали ежедневно для выработки белка путем добавления метанола и инкубировали в течение 4 дней при 28°C, 240 об/мин. После инкубации клетки осаждали центрифугированием и лизировали ультразвуком. Рекомбинантный белок LANCL2 очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (AktaPrime) с использованием аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. Фракции белка элюировали аликвотами по 1 мл и оценивали на содержание LANCL2.

Поверхностный плазмонный резонанс. Biacore T200 использовали для оценки связывания с белком LANCL2. Белок иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. LANCL2 разбавляли 10 мМ натрий-ацетатным буфером при pH 4,0 и иммобилизовали на проточной кювете до уровня ~3700 RU с использованием стандартной химии иммобилизации по аминокислоте. На основании значений иммобилизованного ответа рассчитывали теоретические значения R<sub>max</sub>. Значения R<sub>max</sub> предполагают механизм взаимодействия 1:1. Кинетику за ночь проводили для всех аналитов, связывающихся с иммобилизованными белками. Кинетические эксперименты проводили в присутствии рабочего буфера+1% ДМСО. Скорость потока всех растворов поддерживали при 50 мкл/мин. Концентрации аналита составляли 0 мкМ, 2,5 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ и 40 мкМ.

Результаты.

BT-63 связывался с белком LANCL2 с K<sub>D</sub> 2,74 мкМ. Поверхностный плазмонный резонанс подтверждает предсказанное связывание этого семейства молекул описанной структуры Маркуша с LANCL2. Для сравнения BT-62, молекула, идентичная BT-63, за исключением метилена между пиперазином и карбонилем в BT-63, имела K<sub>D</sub> 18,0 мкМ. Добавление метилена обеспечивает повышенную аффинность к LANCL2 с K<sub>D</sub> в диапазоне, аналогичном диапазону у BT-11, терапевтического средства, нацеленного на LANCL2.

Экспериментальные исследования.

Пример 4. Фармакокинетика BT-63.

Введение.

В дополнение к индукции иммунных эффектов фармацевтическое соединение также должно достигать компарментов внутри тела в адекватных концентрациях, чтобы обеспечить терапевтический эффект. Кроме того, для определения желаемого пути введения необходима ранняя оценка фармакокинетики.

Способы.

Мышам C57BL/6 перорально вводили 10 и 40 мг/кг BT-63 через желудочный зонд раствора метилцеллюлозы, содержащего BT-63. После желудочного зондирования кровь собирали через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 ч после обработки. Плазму собирали из крови центрифугированием. BT-63 экстрагировали из плазмы и количественно определяли с помощью ЖХ-МС/МС.

Результаты.

Пероральное введение BT-63 (10 мг/кг) приводило к максимальной концентрации в плазме 585

нг/мл и площади под кривой воздействия 1055 чнг/мл (фиг. 2). Пероральное введение 40 мг/кг приводило к резкому увеличению максимальной концентрации в плазме (4465 нг/мл), также как к воздействию (11552 нг/мл). Результаты показывают, что ВТ-63 жизнеспособен в качестве терапевтической небольшой молекулы для перорального применения. Основываясь на этих результатах, ВТ-63 представляет собой соединение с высокой биодоступностью в отличие от других соединений, нацеленных на LANCL2, таких как ВТ-11. Примечательно, что при равных пероральных дозах ВТ-63 имеет >100-кратное увеличение максимальной концентрации в плазме у мышей по сравнению с ВТ-11 (4,9 нг/мл при дозе 10 мг/кг).

Пример 5. Выявление иммунных эффектов в CD4+ Т-клетках.

Введение.

Центральное место в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний занимает дисфункция CD4+ Т-хелперных клеток. Эти клетки важны для поддержания здоровья объекта, усиления иммунных ответов и поддержания гомеостаза. Однако в случае аутоиммунного и воспалительного заболевания CD4+ Т-хелперные клетки могут стать сверхактивными, активированными в отсутствие стимулов или неспособными устранить воспаление. При этих сценариях терапевтические средства, которые могут смягчить или предотвратить воспаление, являются ценными методами лечения для контроля заболевания. С этой целью авторы изобретения подтвердили функциональный терапевтический потенциал ВТ-63, ВТ-104-А (см. фиг. 15), ВТ-104-В (см. фиг. 15) и ВТ-104-С (см. фиг. 15), LANCL2-связывающих лигандов в данном типе клеток.

Способы.

Культура клеток. Селезенки иссекали у мышей C57BL/6 и оценивали в состояниях дикого типа и при дефиците LANCL2. Селезенки раздавливали между матовыми концами предметных стекол микроскопа и отфильтровывали, чтобы получить клеточную суспензию. Эритроциты лизировали посредством гипотонического лизиса. Оставшиеся клетки промывали и отфильтровывали. CD4+ Т-клетки обогащали в суспензии с использованием негативной селекции на основе магнитной сортировки. Клетки собирали и высевали в 96-луночные планшеты, покрытые анти-CD3, и культивировали в присутствии ВТ-63 при 0, 0,1, 1 и 10 микромолей или ВТ-104А, ВТ-104В или ВТ-104С при 0,1 микромолей в течение 48 ч. В течение последних 6 ч культивирования клетки стимулировали фторбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и иономицином.

Иммунологический анализ. Клетки собирали из 96-луночных планшетов и окрашивали смесью антител для иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии. Супернатант клеточной культуры собирали и анализировали в отношении концентраций цитокинов с помощью системы цитометрического анализа. Данные записывали на BD FACS Celesta и анализировали с использованием FACS Diva.

Результаты.

ВТ-63 уменьшал доли ИФН $\gamma$ -продуцирующих и ФНО $\alpha$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток в культуре клеток дикого типа и увеличивал доли ИЛ10+ FOXP3+ CD4+ Т-клеток (фиг. 3). В отсутствие LANCL2 эти эффекты были потеряны. Из-за подавления воспалительных цитокинов данные результаты показывают, что ВТ-63 может действовать как активатор LANCL2. Учитывая потерю активности в клетках с дефицитом LANCL2, ВТ-63 оказывает доминирующее механистическое действие через путь LANCL2. В сочетании с результатами связывания *in silico* и *in vitro*, действие через путь LANCL2, вероятно, является результатом прямого связывания с LANCL2.

Кроме того, ВТ-63 предоставляет более сильные иммунные эффекты по сравнению с ВТ-62 (фиг. 4А). В то время как ВТ-63 предоставляет значительное увеличение количества клеток FOXP3+ и значительное снижение количества клеток ИФН $\gamma$ +, ВТ-62 не вызывает никаких изменений при исследуемых концентрациях. Следовательно, алкиленовый линкер между пиперазиновой и карбонильной группами имеет решающее значение для более высокой аффинности связывания с LANCL2 и большей иммунологической эффективности.

Было обнаружено, что ВТ-104-А, ВТ-104-В и ВТ-104-С значительно уменьшают доли ИФН $\gamma$ + CD4+ Т-клеток, при этом ВТ-104-А и ВТ-104-В также значительно снижают доли ФНО $\alpha$ + CD4+ Т-клеток (фиг. 4В). Было обнаружено, что из трех соединений ВТ-104-В оказывает наибольшее численное влияние на ИФН $\gamma$ + клетки и ВТ-104-А оказывает наибольшее численное влияние на ФНО $\alpha$ + клетки, хотя наблюдались только статистические различия в отношении наполнителя.

Пример 6. Применение ВТ-63 на модели СД1 у мышей NOD.

Введение.

Диабет 1 типа (СД1) представляет собой аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система разрушает продуцирующие инсулин клетки поджелудочной железы, что требует пожизненной терапии инсулином с помощью инъекций или помп. При современных методах лечения затруднен гликемический контроль, что приводит к продолжительным периодам гипергликемии и нарушению регуляции метаболизма глюкозы, что способствует повреждению органов и сопутствующим заболеваниям (слепота, почечная недостаточность, сердечно-сосудистое заболевание, потеря конечностей). В настоящее время не одобрены способы лечения для предотвращения прогрессирования заболевания в самом начале (т.е. восстановления иммунологической толерантности к антигенам, ассоциированным с диабетом, чтобы

обеспечить возобновление роста бета-клеток поджелудочной железы) и очень немногие из них одобрены для помощи при контроле гликемии. LANCL2 представляет собой мощный рецептор, который способствует иммунным ответам, клеточному метаболизму и выживаемости клеток. Благодаря этому тройному механизму LANCL2 является привлекательной мишенью для острой и долгосрочной поддерживающей терапии при СД1.

#### Способы.

Модель NOD. В данном исследовании использовали мышей ShiLt, не страдающих ожирением и диабетом (NOD). Мыши NOD обладают многочисленными генетическими мутациями, которые делают возможным спонтанное начало гипергликемии и патологий поджелудочной железы, связанных с СД1. Мыши вступали в эксперимент в возрасте 9 недель и находились под наблюдением в течение 12 периодов. Мышам ежедневно вводили наполнитель, 10 мг/кг ВТ-63 или 20 мг/кг ВТ-63 через желудочный зонд. Один раз в неделю отбирали образцы крови из хвостовой вены для проверки концентрации глюкозы с помощью глюкометра. Через 12 недель мышей умерщвляли для сбора крови и органов для иммунологического тестирования.

Введение лечения. ВТ-63 получали в 0,5% растворе метилцеллюлозы (12-15 сП). Используемая дозировка составляла 10 или 20 мг/кг, вводимые один раз в день. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозировки. Дозировку рассчитывали на основе средней массы тела для каждого пола. Пероральную дозировку вводили через желудочно-кишечный тракт в объеме 0,2 мл.

Иммунологический анализ. Кровь собирали пункцией сердца в гепаринизированную пробирку. Плазму отделяли после центрифугирования и анализировали с помощью Lumiplex на цитокины и гормоны, связанные с развитием СД1. Селезенки иссекали, измельчали и отфильтровывали, чтобы получить клеточную суспензию. Эритроциты лизировали. Клетки метили смесями внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, BCL6, FOXP3, ИФН $\gamma$ , ИЛ21, ИЛ10) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах при подготовке к проточной цитометрии. Данные записывали на BD FACS Celesta и анализировали с использованием FACS Diva.

#### Результаты.

Пероральное введение ВТ-63 защищало от развития гипергликемии. У мышей, получавших ВТ-63, уровни глюкозы в крови были значительно ниже с 19-недельного возраста до конца эксперимента (фиг. 5). Процент мышей с гипергликемией был снижен на 50% в группе, получавшей 20 мг/кг, по сравнению с группой, получавшей наполнитель, в то время как HbA1c в возрасте 21 недели был снижен в обеих группах с дозой 10 мг/кг и 20 мг/кг. В селезенке пероральное введение ВТ-63 увеличивало соотношение CD4+ ИЛ10+ к CD4+ ИФН $\gamma$ +, в то время как уменьшая Т-фолликулярные хелперные (Tfh) клетки (BCL6+ ИЛ21+) и увеличивая PD1+ CD4+ Т-клетки (фиг. 6). ВТ-63 также увеличивал уровни инсулина и С-пептида в плазме и снижал МСР-1 и ФНО (фиг. 7). Данные подтверждают, что ВТ-63 используется как профилактическая и восстанавливающая терапия при СД1.

Пример 7. Применение ВТ-63 на мышинной модели СКВ, индуцированной TLR.

#### Введение.

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой системное аутоиммунное заболевание, которое может вызывать повреждение почек, сердечно-сосудистой системы и суставов. Вследствие самоотолерантности стандартный апоптоз клеток приводит к образованию ядерных антигенов, которые обрабатываются без иммунного ответа у людей, не страдающих СКВ. Однако при СКВ иммунная система реагирует на эти антигены, генерируя антитела к двухцепочечной ДНК (дцДНК) и другим ядерным антигенам, которые образуют иммунные комплексы, которые могут откладываться по всему телу и вызывать необоснованные иммунные ответы. В настоящее время заболевание лечат стероидами, биологическими препаратами и другими иммунодепрессантами с высокой вероятностью пагубных побочных эффектов и ослабления иммунной системы организма. Лечение с помощью активирующих лигандов LANCL2 может восстановить иммунологическую толерантность и снизить выработку самонаправленных антител.

#### Способы.

Модель резиквимода. Резиквимод получали в смеси этанол:ацетон 1:3, чтобы предоставить каждой мышце 85 мкг резиквимода. Раствор резиквимода тщательно перемешивали и наносили на ухо мышцей C57BL6 три раза в неделю в течение 2-недельного периода. Мышей контролировали ежедневно на предмет признаков заболевания.

Введение лечения. ВТ-63 получали в 0,5% растворе метилцеллюлозы (12-15 сП). Используемая дозировка составляла 20 мг/кг один раз в день. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозировки. Дозировку рассчитывали на основе средней массы тела для каждого пола. Пероральную дозу вводили через желудочно-кишечный тракт в объеме 0,2 мл.

Иммунологический анализ. Кровь собирали пункцией сердца в пробирку с ЭДТА. Плазму отделяли после центрифугирования и анализировали с помощью ELISA в отношении анти-дцДНК антител. Мочу собирали для анализа на содержание альбумина для проверки функции почек. Селезенки иссекали, измельчали и отфильтровывали, чтобы получить клеточную суспензию. Эритроциты лизировали. Клетки

метилю смеси внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, BCL6, FOXP3, ИФН $\gamma$ , ИЛ6, ИЛ10) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах при подготовке к проточной цитометрии. Данные записывали на BD FACS Celesta и анализировали с использованием FACS Diva.

Результаты.

Пероральное введение ВТ-63 снижает концентрацию анти-дцДНК антител в плазме после 2 недель лечения и обеспечивает снижение содержания альбумина в моче, что приводит к двум преимуществам, специфичным для патогенеза СКВ (фиг. 8). Иммунологические различия присутствуют в селезенке в виде уменьшенных ИФН $\gamma$ + CD8+ Т-клеток и ИЛ6+ клеток, что указывает на уменьшенное воспаление.

Пример 8. Применение ВТ-63 на модели хронического ВЗК.

Введение.

Болезнь Крона и язвенный колит представляют собой хронические заболевания со спорадическими периодами нерешенных воспалительных обострений, приводящих к прогрессирующему повреждению слизистой оболочки кишечника. Потеря Mdr1a у мышей ухудшает способность эпителиальных клеток правильно обрабатывать и выводить продукты жизнедеятельности, что приводит к спонтанному колиту. Колит у данных мышей является хроническим и проникает через слои кишечника. Таким образом, модель Mdr1a-/- является идеальной моделью для исследования длительного введения терапевтического средства для индукции и поддержания пониженной степени тяжести заболевания.

В отличие от других генетических моделей заболевания, которые могут породить мышей с ослабленным иммунитетом, мыши Mdr1a-/- являются иммунокомпетентными, причем делеция вместо этого влияет на способность клеток отталкивать молекулы и предотвращать клеточный стресс. Накопление продуктов жизнедеятельности и клеточных побочных продуктов приводит к нарушению регуляции жизненного цикла эпителиальных клеток и повышенной секреции воспалительных цитокинов и хемокинов. Таким образом, предоставляется хроническое и спонтанное начало заболевания с первичными исходными явлениями, происходящими внутри эпителия. Кроме того, ген MDR1 представляет собой новый аллель риска ВЗК и влияет на чувствительность к лечению на основе глюкокортикоидов. Способность ВТ-63 обеспечивать терапевтическую эффективность в отсутствие этого гена является важным показателем устойчивости при наличии генетических аномалий и указывает на способность к трансляции человека в хирургически сохраняющем контексте.

Способы.

Модель MDR1a-/- у мышей с дефицитом MDR1a спонтанно развивается колит. MDR1a-/- начинали получать лечение ВТ-63 (перорально, 20 мг/кг) в возрасте 6 недель и продолжали лечение до возраста 10 недель. Мышей взвешивали и оценивали еженедельно.

Введение лечения. ВТ-63 получали в 0,5% растворе метилцеллюлозы (12-15 сП). Используемая дозировка составляла 20 мг/кг один раз в день. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозировки. Дозировку рассчитывали на основе средней массы тела для каждого пола. Пероральную дозу вводили через желудочно-кишечный тракт в объеме 0,2 мл.

Проточная цитометрия. Колонки собирали в буфер RPMI/FBS, содержащий коллагеназу (300 ед./мл) и ДНКазу (50 ед./мл) для переваривания. Ткани переваривали в течение 60 мин при перемешивании при 37°C. Полученные клеточные суспензии отфильтровывали через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировали (300×g, 8 мин) и промывали свежим RPMI. После фильтрования полученных суспензий единичных клеток иммунные клетки очищали градиентом перколлола, содержащим клетки 40% Перколлола, наслаенном на 70% раствор перколлола. После центрифугирования интерфазу собирали и промывали для получения обогащенных фракций клеток собственной пластинки толстой кишки. Клетки метилил смеси внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, ROR $\gamma$ T, FOXP3, ИФН $\gamma$ , ИЛ17, ИЛ10) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах. Данные получали с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACS Diva.

Результаты.

Пероральное введение ВТ-63 снижает активность заболевания у мышей Mdr1a-/-. Активность заболевания на данной модели колита представляет собой суммарную оценку потери веса, наличия и степени тяжести ректального кровотечения, консистенции кала, симптомов боли и общего поведения мыши. ВТ-63 снижал активность заболевания на протяжении всего периода заражения с максимальным наблюдаемым снижением на 90% на четвертой неделе лечения. В собственной пластинке толстой кишки ВТ-63 значительно изменяет пропорции иммунных клеток (фиг. 9). В частности, ВТ-63 снижает пропорции Th1, Th17 и нейтрофилов, трех основных подгрупп клеток, ответственных за воспаление слизистой оболочки толстой кишки. В толстой кишке увеличивались доли регуляторных CD4+ CD25+ Т-клеток. Между тем, количество Th1-клеток селезенки уменьшилось и CD25+ Tregs селезенки увеличилось после лечения ВТ-63 (фиг. 10). Эффективность ВТ-63 на мышинной модели ВЗК с высокой трансляцией подчеркивает применение ВТ-63 в качестве перорального терапевтического средства для лечения БК и ЯК.

Пример 9. Эффективность ВТ-63 на модели вирусной инфекции.

Активация LANCL2 специфическими лигандами может модулировать иммунный ответ, предотвращать процессы проникновения или репликации вируса, чтобы уменьшить вирусную нагрузку и способствовать восстановлению и гомеостазу местной ткани. Чтобы проверить эффективность ВТ-63, авторы изобретения будут использовать мышиную модель заражения вирусом гриппа.

Способы.

Мышиная модель. Мышей C57BL/6 дикого типа в возрасте восьми-десяти недель анестезировали путем ингаляции изофлурана. Мышей инфицировали гриппом А (H1N1) интраназально при разрешающей дозе 350 БОЕ/мышь. Мышам ежедневно вводили ВТ-63 в дозе 20 мг/кг перорально через желудочный зонд. Мышей взвешивали и оценивали ежедневно в течение 12 дней. На 12-й день мышей умерщвляли для измерения иммунных ответов с помощью проточной цитометрии в легких.

Проточная цитометрия. Легкие будут нарезать на мелкие кусочки и собирать в буфер RPMI/FBS/CaCl<sub>2</sub>, содержащий коллагеназу (300 ед./мл) и ДНКазу (50 ед./мл) для переваривания. Ткани будут переваривать от 60 до 90 мин при перемешивании при 37°C. Полученные клеточные суспензии будут отфильтровывать через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировать (300×g, 8 мин) и промывать свежим RPMI. Эритроциты будут лизировать путем гипотонического лизиса и удалять фильтрованием. Клетки будут промывать и сеять для окрашивания проточной цитометрией. Клетки будут метить смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, CD11c, Gr1, CX3CR1, CD64, SiglecF, Ly6C) и внутриклеточных (Tbet, RORγT, FOXP3, ИФНγ, ИЛ6, ИЛ10, ИФНб) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах. Данные будут получены с использованием проточного питометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Результаты.

Пероральное введение ВТ-63 защищает от смертности и сокращает проявление симптомов, связанных с гриппом (фиг. 11). ВТ-63 значительно снижает индекс активности заболевания с 3-го дня после заражения до 12-го дня после заражения по сравнению с животными, получавшими наполнитель. Кроме того, ВТ-63 увеличивает выживаемость более чем на 50% по сравнению с наполнителем. Иммунологически ВТ-63 увеличивает количество ИЛ10+ CD8+ Т-клеток и альвеолярных макрофагов на 12-й день после инфицирования в легких (фиг. 12). Эти два типа клеток ранее были охарактеризованы как важные клетки при выздоровлении от легочных вирусных инфекций. Кроме того, у мышей, которым вводили ВТ-63, снизилась пропорция ФНОα+ CD4+ Т-клеток и нейтрофилов в легких, типов клеток, связанных с повреждением тканей. В совокупности данные подтверждают защитное действие ВТ-63 при вирусных инфекциях.

Пример 10. Лечение *ex vivo* CD4+ Т-клетками для лечения воспалительного заболевания.

ВТ-63 посредством иммунометаболической передачи сигналов изменяет фенотипический профиль клеток *in vitro* и иммунные ответы *in vivo*. В частности, ВТ-63 формирует CD4+ Т-клетки для увеличения экспрессии FOXP3, увеличения подавляющей способности и повышения стабильности этих регуляторных клеток в условиях воспаления. Следовательно, адаптивный перенос клеток, обработанных ВТ-63 *ex vivo*, является предпочтительным при лечении воспалительных заболеваний и нарушений с неадекватными ответами CD4+ Т-клеток, таких как воспалительное заболевание кишечника, болезнь "трансплантат против хозяина" и другие, описанные в настоящей заявке.

Способы.

Наивные CD4+ Т-клетки можно выделить из селезенки мышей с помощью магнитной сортировки. Выделенные клетки можно инкубировать в 96-луночных планшетах, покрытых анти-CD3/анти-CD28, в среде для дифференцировки Treg. Среда для дифференцировки Treg может быть средой Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM) (ThermoFisher Scientific) с добавлением фетальной бычьей сыворотки, NERES, пенициллина/стрептомицина, L-глутамин и дифференцирующих агентов. Дифференцирующими агентами Treg могут быть 10 нМ полностью транс-ретиноевой кислоты и 5 нг/мл ТФР-β. Дополнительные эксперименты могут быть проведены для сравнения дифференцировки в среде для дифференцировки Treg с добавлением и без добавления 10 нг/мл ИЛ-2 или ИЛ-12. Клетки можно инкубировать с наполнителем, 10 нМ или 100 нМ ВТ-63 в среде для дифференцировки в течение 48 ч до анализа. Перед анализом клетки можно стимулировать ФМА и иономицином в течение 6 ч.

В экспериментах по переносу донорные селезенки можно измельчить и обогатить CD4+ фракцией с помощью магнитной сортировки. Клетки CD4+CD45RB<sup>hi</sup>CD25<sup>-</sup> (Teff) и CD4+CD45RB<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg<sub>g</sub>) можно сортировать с помощью сортировщика клеток FACS Aria. Выделенные Tregs можно культивировать в течение 12 ч в присутствии наполнителя или ВТ-63 (100 нМ). Выделенные Teff можно культивировать в течение 12 ч в наполнителе. Исходя из указанной экспериментальной группы, мышереципиенты Rag2<sup>-/-</sup> могут получать 4×10<sup>5</sup> Teff и 1×10<sup>5</sup> Treg клеток из групп, обработанных наполнителем или ВТ-63 путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей можно взвешивать и оценивать еженедельно до умерщвления через 5 недель после переноса.

Лимфоциты собственной пластинки толстой кишки и культивируемые клетки могут быть помещены в 96-луночные планшеты (6×10<sup>5</sup> клеток/луночка) и обработаны для иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии, как описано ранее. Вкратце, клетки можно инкубировать с антителами,

конъюгированными с флуорохромом, к внеклеточным маркерам: CD45, CD4, CD3, CD25, CD8. Образцы, требующие вторичного окрашивания, можно инкубировать со вторичными антителами или флуорохромом, конъюгированным со стрептавидином. Затем образцы можно зафиксировать и сделать проницаемыми. Клетки можно инкубировать с антителами к внутриклеточным маркерам: Tbet, ИФН $\gamma$ , ИЛ10, FOXP3, ИЛ17, ROR $\gamma$ T. Данные могут быть получены с помощью проточного цитометра BD FACS Celesta и проанализированы с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD Pharmingen).

Результаты.

Учитывая важность CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток для эффективности ВТ-63, авторы изобретения стремятся подтвердить прямое влияние ВТ-63 на их дифференцировку и способность сохранять фенотип при воспалительных условиях. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки можно дифференцировать в Tregs *in vitro* в присутствии или в отсутствие ИЛ-2 в соответствии со способами, описанными выше. Авторы изобретения прогнозируют, что обработка ВТ-63 (100 нМ) значительно увеличит формирование CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> подтипа в отсутствие ИЛ-2, разница, которая в дальнейшем будет усилена добавлением ИЛ-2. Авторы изобретения прогнозируют, что при таких низких концентрациях, как 10 нМ, ВТ-63 будет индуцировать значительно больше CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> клеток в присутствии ИЛ-2. Авторы изобретения прогнозируют, что в этих условиях дифференцировки будут наблюдаться только низкие уровни смешанного CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> подтипа и это не будет статистически изменено ВТ-63. Авторы изобретения прогнозируют, что ВТ-63 сохранит значительно более высокие уровни CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> клеток в обработанных ИЛ-12 образцах. Это будет контрастировать с подавлением CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> клеток в обработанных ИЛ-12 образцах в отсутствие ВТ-63. Добавление ИЛ-12 также вызовет увеличение CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> клеток во всех группах, хотя ВТ-63 обеспечит дозозависимую защиту от данной смешанной подгруппы.

Чтобы идентифицировать сигнальные пути, модулируемые ВТ-63 *in vivo*, авторы изобретения будут выделять CD4<sup>+</sup> Т-клетки толстой кишки от мышей Mdr1a<sup>-/-</sup>, обработанных наполнителем и ВТ-63, при появлении колита в возрасте 10 недель. В CD4<sup>+</sup> Т-клетках пероральное введение ВТ-63 приведет к значительно более высокой экспрессии Stat5a и Foxo1, двух участников пути передачи сигнала ИЛ-2. Между тем, экспрессия Pten и Phlpp1 будет увеличиваться. *In vitro* STAT5a будет фосфорилироваться в большем соотношении в образцах, обработанных ВТ-63, в основных средах для дифференцировки Treg, а также в средах для дифференцировки Treg, дополненных или ИЛ-2, или ИЛ-12. FOXO1 будет аналогичным образом затронут как в основных средах для дифференцировки Treg, так и в средах для дифференцировки Treg, содержащих ИЛ-2, но не в средах для дифференцировки Treg, содержащих ИЛ-12. Клетки также будут дифференцироваться в присутствии ингибиторов PTEN (SF1670) или STAT5 (STAT5i). В среде для дифференцировки Treg, содержащей как ИЛ-2, так и ИЛ-12, добавление STAT5i будет предотвращать эффекты ВТ-63 на CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> клетки. Напротив, только SF1670 будет предотвращать эффекты ВТ-63 на CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> клетки в среде, содержащей ИЛ-2.

У мышей Rag2<sup>-/-</sup> отсутствуют зрелые Т- и В-лимфоциты. Следовательно, у этих мышей не развиваются механизмы самопереноса, микробного гомеостаза и общей иммунорегуляции. Перенос наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Rag2<sup>-/-</sup> мышей вызывает воспаление кишечника, возникающее из-за отсутствия этих механизмов, за счет расширения перенесенных клеток *in vivo* и дифференцировки в воспалительные фенотипы аналогично тому, как это происходит при активных воспалительных аутоиммунных заболеваниях, включая, но не ограничиваясь ими, воспалительное заболевание кишечника. Авторы изобретения предполагают, что перенос регуляторных клеток, обработанных *ex vivo* ВТ-63, предоставит животным-реципиентам механизмы гомеостаза и иммунорегуляции.

Адоптивный перенос Tregs, обработанных *ex vivo* ВТ-63 (100 нМ), снизит общую степень тяжести заболевания и обеспечит поддержание иммунных преимуществ до исследуемой предельной продолжительности в 5 недель после переноса. В дополнение к общему улучшению заболевания обработка Tregs *ex vivo* ВТ-63 приведет к изменению фенотипов клеток собственной пластинки толстой кишки. В группах Treg, обработанных ВТ-63, снижается количество ИФН $\gamma$ -продуцирующих и ИЛ-17<sup>+</sup> ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Между тем, количество CD25<sup>+</sup> Tregs будет увеличиваться, что указывает на повышенную стабильность и повышенную способность служить популяцией-основателем регуляторных клеток. Кроме того, взаимодействие с осью передачи сигналов ИЛ-2/STAT5 будет способствовать важным изменениям в цитокиновом и хемокиновом микроокружении, которые усиливают эффекты перенесенных клеток.

Данные результаты покажут, что эффекты ВТ-63 на иммунные клетки при введении *in vivo* будут воспроизведены при лечении иммунных клеток *ex vivo*. Авторы изобретения прогнозируют, что введение подготовленных клеток изобретения животному будет эффективным при лечении любого из состояний, описанных в настоящем изобретении, помимо воспалительных заболеваний, таких как ВЗК.

Пример 11. Применение ВТ-63 на мышинной модели генетического СКВ.

Введение.

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой системное аутоиммунное заболевание, которое может вызывать повреждение почек, сердечно-сосудистой системы и суставов. СКВ является результатом сложного взаимодействия генетических факторов, которое приводит к иммунологическому заболеванию, проявляющемуся в первую очередь через образование аутоантител. Одна из доклиниче-

ских моделей, нацеленная на улавливание этих сложных факторов, представляет собой NZB/W F1 модель. Скрещивание F1 NZB и NZW мышей приводит к получению мышей с аутоиммунитетом прогрессирующей степени тяжести. Этот аутоиммунитет имеет много общих черт с СКВ человека, включая образование антинуклеарных антител, повреждение почек и усиленные ответы интерферона типа I.

Способы.

NZB/W F1 модель. Двадцатичетырехнедельные самки мышей NZB/W F1 были рандомизированы в группы, получавшие наполнитель или ВТ-63, на основании исходных уровней белка в моче (n=10). ВТ-63 вводили перорально ежедневно в дозе 20 мг/кг в течение 12 недель. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозировки. Дозировку рассчитывали исходя из средней массы тела.

Иммунологический анализ. Кровь собирали пункцией сердца в пробирку с ЭДТА. Плазму отделяли после центрифугирования и анализировали с помощью ELISA в отношении анти-дцДНК антител и ИФН- $\alpha$ . Мочу собирали для анализа на содержание белка для проверки функции почек. Селезенки иссекали, измельчали и отфильтровывали, чтобы получить клеточную суспензию. Эритроциты лизировали. Клетки метили смесями внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD138, CD25, МНСII, CD11b, CD11c, CXCR3, IgD, IgM) и внутриклеточных (BCL6, FOXP3, ИЛ21, ИЛ6, ИЛ10) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах при подготовке к проточной цитометрии. Данные записывали на BD FACS Celesta и анализировали с использованием FacsDiva.

Результаты.

Перорально вводимый ВТ-63 защищал мышей от потери веса и предотвращал ухудшение показателя протеинурии по сравнению с исходным уровнем (фиг. 13). У мышей, получавших ВТ-63, наблюдались пониженные уровни анти-дцДНК и уровни ИФН- $\alpha$  в плазме в возрасте 36 недель (12 недель лечения). Лечение ВТ-63 привело к умеренному снижению фолликулярных В-клеток и плазматических клеток в селезенке, в частности CXCR3+ плазматических клеток, основного патогенного подмножества волчанки. Однако наблюдалось большее снижение количества ИЛ6+ миелоидных клеток, CD25+ FOXP3+ регуляторных CD4+ Т-клеток и ИЛ21+ BCL6+ фолликулярных хелперных Т-клеток по сравнению с наполнителем (фиг. 14).

Пример 12. Применение ВТ-104-В на модели неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).

Введение.

НАСГ представляет собой прогрессирующее хроническое заболевание печени, которым страдают более 140 миллионов человек во всем мире, а общие расходы на здравоохранение только в США превышают 8 миллиардов долларов ежегодно. Никакие современные терапевтические средства для лечения НАСГ не одобрены. Несмотря на то, что это обратимое состояние, неэффективное лечение НАСГ приводит к более высокому риску гепатоцеллюлярной карциномы, печеночной недостаточности и сердечной смерти. НАСГ представляет собой сложное заболевание, связанное с множеством печеночных и внепеченочных факторов. Тем не менее, многие разрабатываемые терапевтические средства не могут справиться со всеми тремя основными областями нарушения регуляции, состоящими из метаболических, воспалительных и фиброзных факторов.

Способы.

Модель, индуцированная WD. Мышам C57BL/6 каждые две недели вводили внутрибрюшинные инъекции 0,5 мкл/г CCl<sub>4</sub> для индукции стеатогепатита в течение 4 недель. Мышей лечили ежедневно терапевтическим способом после 2 недель инъекций. Лечение ВТ-104-В (20 мг/кг) или контроль наполнителем осуществляли через желудочный зонд. Дозировку рассчитывали исходя из средней массы тела.

Анализ. Печень вырезали и взвешивали. Срезы печени вырезали и хранили в буферном формалине для окрашивания сириусом красным или быстро замораживали для оценки фиброза. Степень тяжести фиброза оценивали по шкале окрашивания печени Сириусом красным при микроскопическом исследовании.

Результаты.

Пероральное введение ВТ-104-В снижало массы печени (фиг. 16А) и оценку фиброза (фиг. 16В) после 2 недель лечения, что указывает на способность уменьшать воспаление и фиброз печени в отношении НАСГ.

Пример 13. Применение ВТ-104-В на мышинной модели ревматоидного артрита.

Введение.

Ревматоидный артрит (РА) вызывает сильное воспаление суставов, ведущее к потере подвижности и сильной боли. Основопологающая иммунология синовиального воспаления является сложной, включая взаимодействие миелоидных клеток, Т-клеток, фибробластов и других структурных клеток синовиальной оболочки. Высокая экспрессия ФНО и ИЛ-6 играет центральную роль в патогенезе РА с дополнительным вкладом ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-23, МСР1 и ТФР- $\beta$ . Вместе эти цитокины могут приводить к рекрутингу лейкоцитов, ремоделированию костей, образованию паннуса, окислительному стрессу и гиперплазии слизистой оболочки сустава.

Способы.

Модели. Шестинедельных мышей C57B1/6 иммунизировали 200 мкг куриного коллагена, эмульги-



рованного в полном адьюванте Фрейнда, путем внутрикожных инъекций в основание хвоста. Мышей обрабатывали 20 мг/кг ВТ-104-В или наполнителем ежедневно в течение четырех недель.

Иммунологический анализ. У мышей иссекали селезенки. Ткани измельчали и отфильтровывали, чтобы получить клеточную суспензию. Эритроциты лизировали. Клетки метили смесями внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c) и внутриклеточных (ИФН $\gamma$ , ИЛ17, ФНО) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах для подготовки к проточной цитометрии. Данные записывали на BD FACS Celesta и анализировали с использованием FACSDiva.

Результаты.

Пероральное введение ВТ-104-В значительно снижало долю ИЛ-17 $^+$  CD4 $^+$  Т-клеток (фиг. 17А), ИФН $\gamma$  $^+$  CD4 $^+$  Т-клеток (фиг. 17В) и ФНО $^+$  CD11b $^+$  CD11c $^+$  миелоидных клеток (фиг. 17С) в селезенке мышей с артритом, индуцированным коллагеном, по сравнению контрольными животными, получавшими наполнитель. Это указывает на способность ВТ-104-В и родственных соединений лечить ревматоидный артрит.

Пример 14. Применение ВТ-104-В на мышинной модели генетического СКВ.

Введение.

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой системное аутоиммунное заболевание, которое может вызывать повреждение почек, сердечно-сосудистой системы и суставов. СКВ является результатом сложного взаимодействия генетических факторов, которое приводит к иммунологическому заболеванию, проявляющемуся в первую очередь через образование аутоантител. Одна из доклинических моделей, нацеленная на улавливание этих сложных факторов, представляет собой NZB/W F1 модель. Скрещивание F1 NZB и NZW мышей приводит к получению мышей с аутоиммунитетом прогрессирующей степени тяжести. Этот аутоиммунитет имеет много общих черт с СКВ человека, включая образование антиядерных антител, повреждение почек и усиленные ответы интерферона типа I.

Способы.

NZB/W F1 модель. Двадцатичетырехнедельные самки мышей NZB/W F1 были рандомизированы в группы, получавшие наполнитель или ВТ-104-В, на основании исходных уровней белка в моче. ВТ-104-В вводили ежедневно в дозе 20 мг/кг в течение 12 недель. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозировки. Дозировку рассчитывали исходя из средней массы тела.

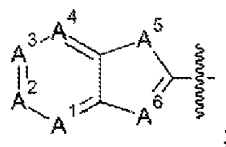
Иммунологический анализ. Селезенки иссекали, измельчали и отфильтровывали, чтобы получить клеточную суспензию. Эритроциты лизировали. Клетки метили смесями внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD25) и внутриклеточных (ИЛ21, ИЛ17, FOXP3) антител при последовательном живом окрашивании в 96-луночных планшетах для подготовки к проточной цитометрии. Данные записывали на BD FACS Celesta и анализировали с использованием FACSDiva.

Результаты.

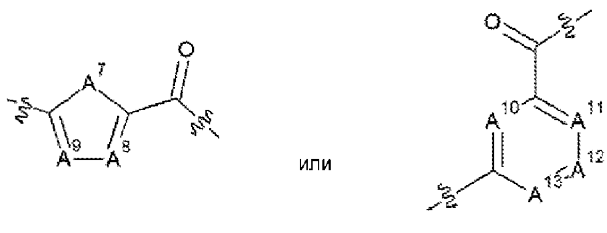
Пероральное введение ВТ-104-В значительно снижало долю ИЛ-17 $^+$  CD4 $^+$  Т-клеток (фиг. 18А) и ИЛ21 $^+$  CD4 $^+$  Т-клеток (фиг. 18В), при этом значительно увеличивая долю CD25 $^+$  FOXP3 $^+$  CD4 $^+$  Т-клеток (фиг. 18С) в селезенках мышей NZB/W F1 по сравнению с контрольными животными, получавшими наполнитель. Это указывает на способность ВТ-104-В и родственных соединений лечить СКВ.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы Z-Y-Q-Y' или его фармацевтически приемлемая соль, в которой:  
Z представляет собой:



Y представляет собой:



Q представляет собой пиперазин-1,4-диил или пиперазин-2,6-дион-1,4-диил;  
Y' представляет собой:



--- между  $A^{15}$  и  $A^{16}$  отсутствует;

$A^1, A^2, A^3, A^8, A^9, A^{11}, A^{12}, A^{13}, A^{18}, A^{20}$  и  $A^{22}$  представляют собой каждый  $C(R^3)$ ;

каждый из  $A^4, A^{19}$  и  $A^{21}$  независимо представляет собой  $C(R^3)$  или N;

каждый из  $A^6, A^{10}$  и  $A^{17}$  представляет собой N;

$A^5$  представляет собой  $N(R^3)$  или O;

$A^7$  представляет собой  $N(R^3)$ ;

$A^{14}$  представляет собой O;

$A^{15}$  и  $A^{16}$  представляют собой каждый  $C(R^3)_2$ ;

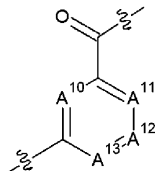
$R^1$  представляет собой  $C_1, C_2$  или  $C_3$  алкилен, необязательно замещенный одной или более  $C_1$ - $C_6$  алкильными группами;

$R^3$  в каждом случае представляет собой независимо атом водорода,  $C_1$ - $C_6$ -алкил или циано.

2. Соединение по п.1, в котором  $A^4$  представляет собой CH.

3. Соединение по п.1, в котором  $A^5$  представляет собой NH.

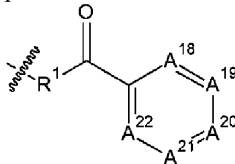
4. Соединение по п.1, в котором Y представляет собой:



5. Соединение по п.1, в котором Q представляет собой пиперазин-1,4-диил.

6. Соединение по п.1, в котором Q представляет собой пиперазин-2,6-дион-1,4-диил.

7. Соединение по п.1, в котором Y' представляет собой:



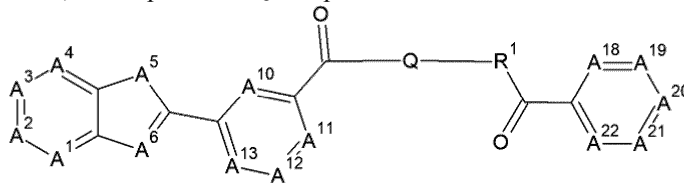
8. Соединение по п.7, в котором  $R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_{1-3}-$  или  $-C(CH_3)_2-$ .

9. Соединение по п.7, где каждый из  $A^{19}$  и  $A^{21}$  представляет собой CH.

10. Соединение по п.7, где  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой циано.

11. Соединение по п.1, где каждый  $R^3$  представляет собой атом водорода, за исключением того, что  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой атом водорода или циано.

12. Соединение по п.1, в котором Z-Y-Q-Y' представляет собой:



$A^4$  представляет собой CH;

$A^5$  представляет собой NH;

каждый из  $A^{19}$  и  $A^{21}$  представляет собой CH;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_{1-3}-$  или  $-C(CH_3)_2-$ ; и

каждый  $R^3$  представляет собой атом водорода, за исключением того, что  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой атом водорода или циано.

13. Соединение по п.12, где Q представляет собой пиперазин-1,4-диил.

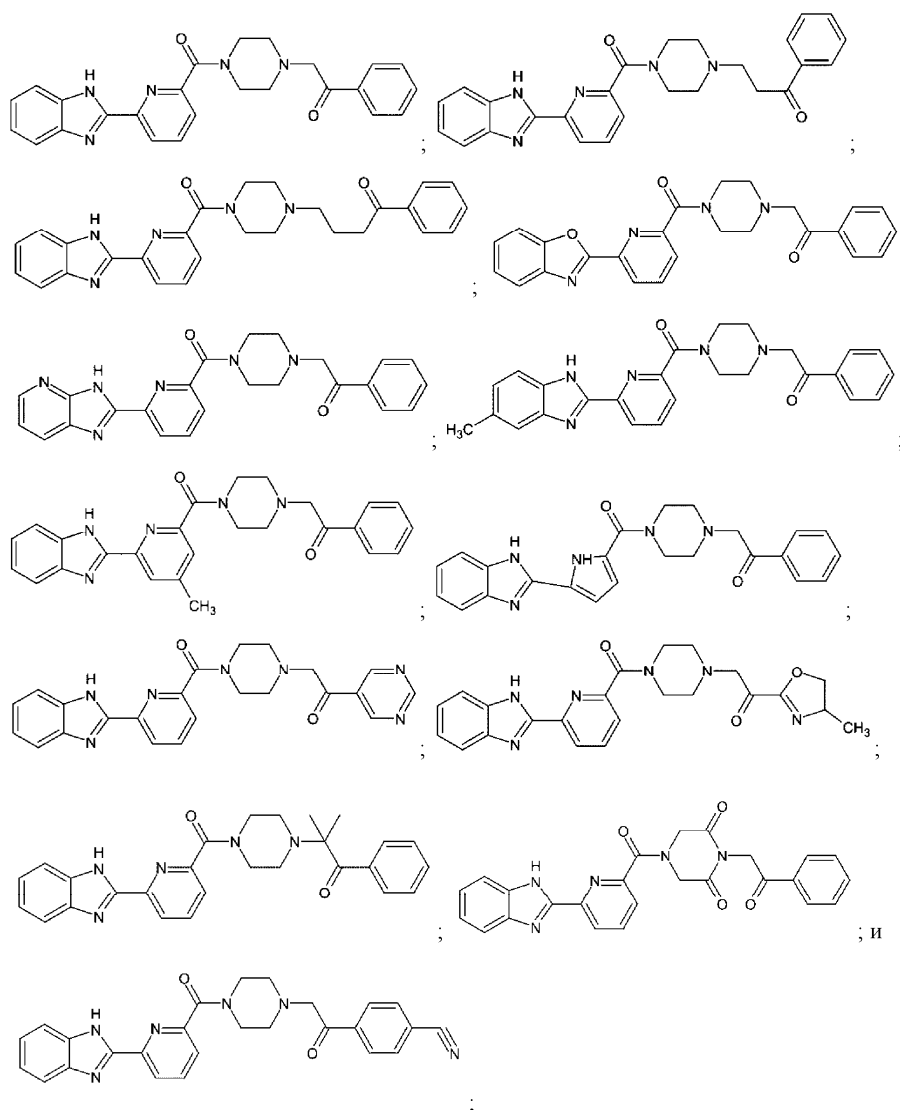
14. Соединение по п.12, где Q представляет собой пиперазин-2,6-дион-1,4-диил.

15. Соединение по п.12, где  $R^1$  представляет собой  $-(CH_2)-$ .

16. Соединение по п.12, где  $R^1$  представляет собой  $-C(CH_3)_2-$ .

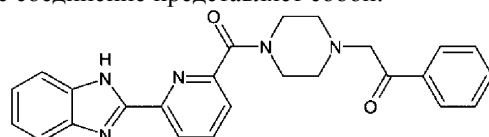
17. Соединение по п.12, где  $R^3$  в  $A^{20}$  представляет собой циано.

18. Соединение по п.1, в котором соединение выбрано из:



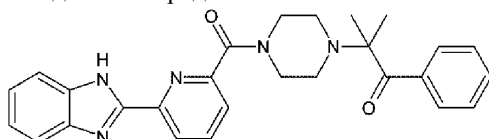
или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

19. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой:



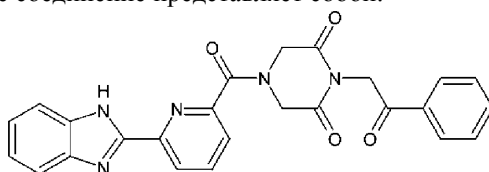
или его фармацевтически приемлемая соль.

20. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой:



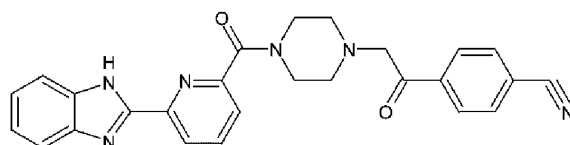
или его фармацевтически приемлемая соль.

21. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

22. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

23. Способ лечения заболевания у животного, в котором заболевание выбрано из аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, хронического воспалительного заболевания, диабета и инфекционного заболевания, включающий введение животному эффективного количества соединения по любому одному из пп.1-22.

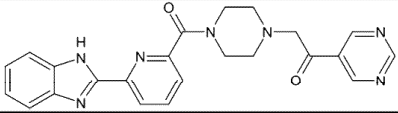
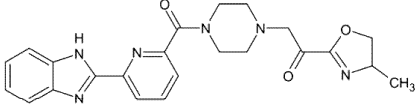
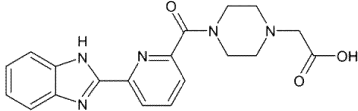
24. Способ по п.23, в котором заболевание выбрано из волчанки, синдрома Шегрена, ревматоидного артрита, диабета 1 типа, воспалительного заболевания кишечника, вирусного заболевания и неалкогольного стеатогепатита.

ID	Структура	Аффинность (ккал/моль)
BT-63		-7.8
BT-64		-7.7
BT-65		-7.5

Фиг. 1А

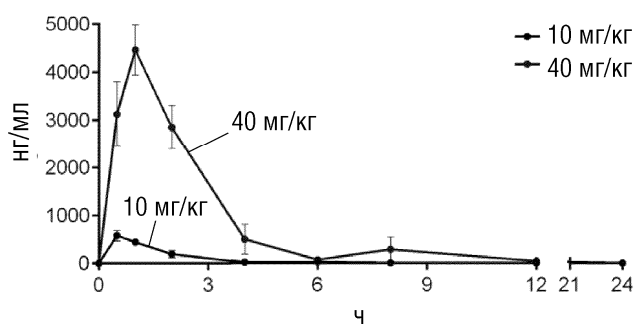
ID	Структура	Аффинность (ккал/моль)
BT-71		-7.9
BT-72		-7.7
BT-73		-7.9
BT-74		-8.0
BT-75		-7.5

Фиг. 1В

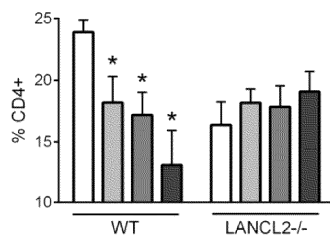
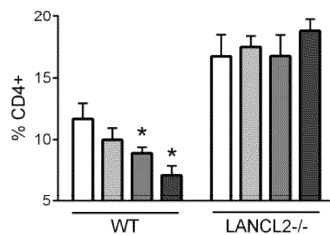
ID	Структура	Аффинность (ккал/моль)
BT-95		-8.1
BT-96		-7.7
BT-99		-7.2

Фиг. 1С

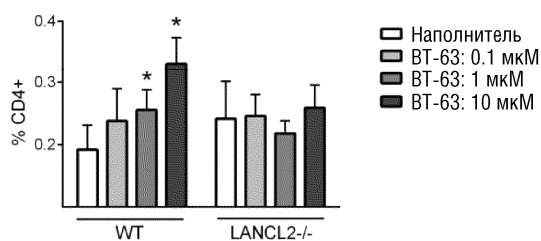
## BT-63 в плазме



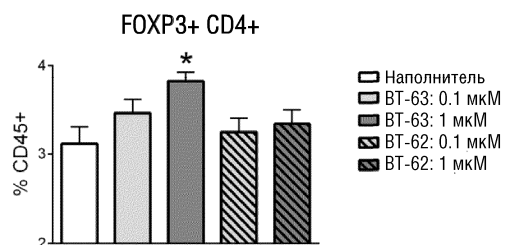
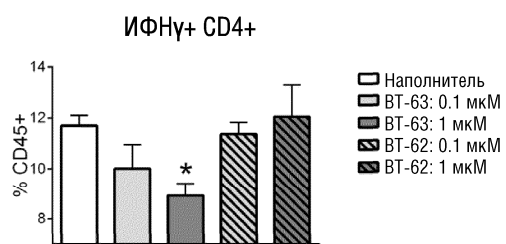
Фиг. 2

ФНО $\alpha$ +ИФН $\gamma$ +

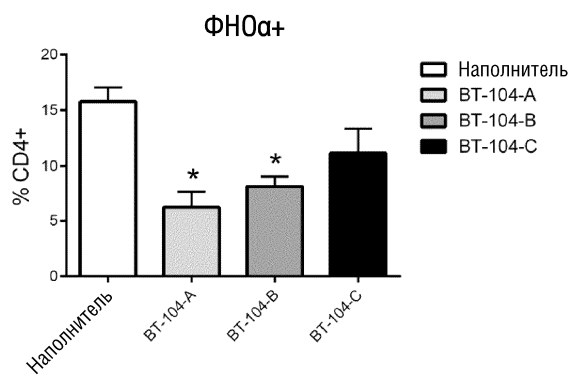
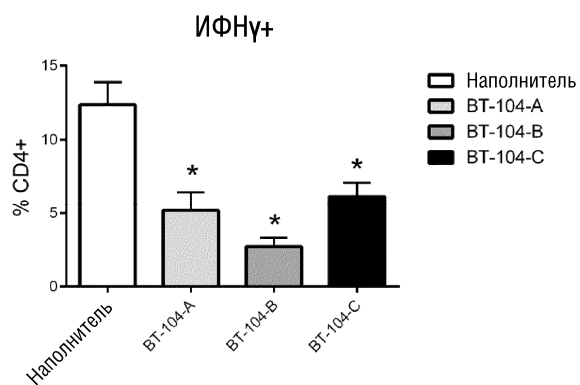
## ИЛ10+ FOXP3+



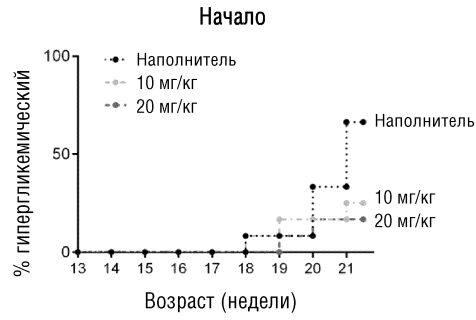
Фиг. 3



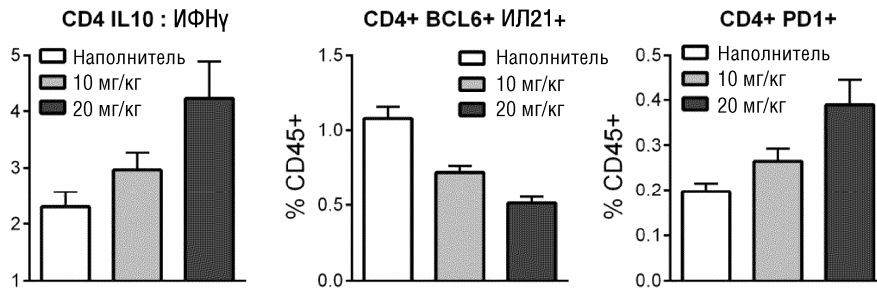
Фиг. 4А



Фиг. 4В

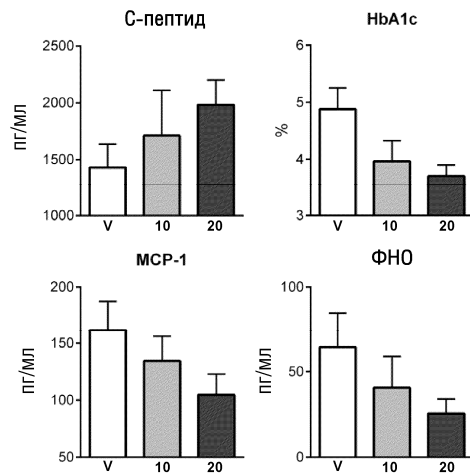


Фиг. 5

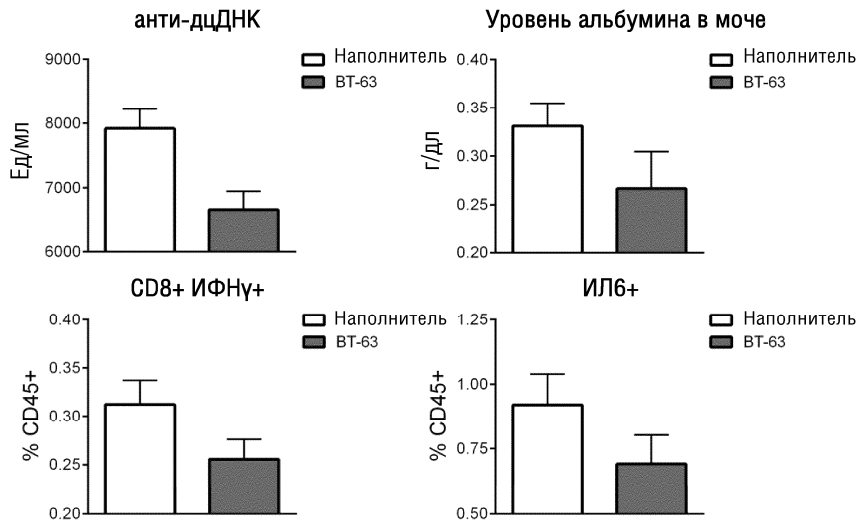


Фиг. 6

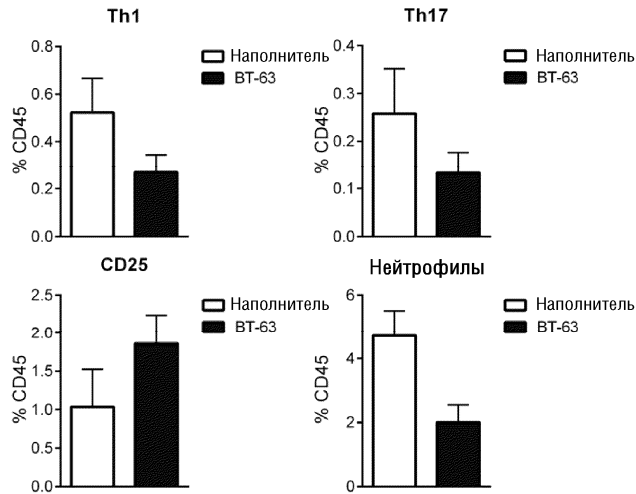
Наполнитель  
 10 мг/кг (10)  
 20 мг/кг (20)



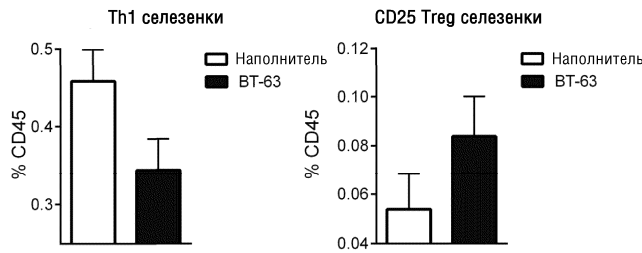
Фиг. 7



Фиг. 8

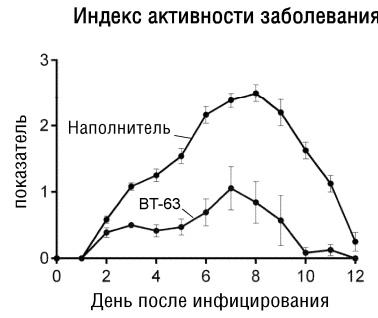
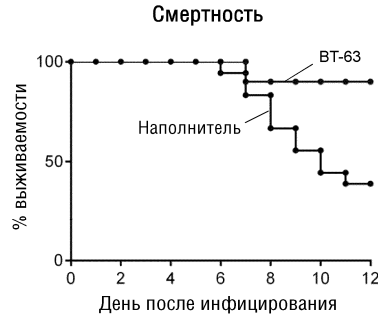


Фиг. 9

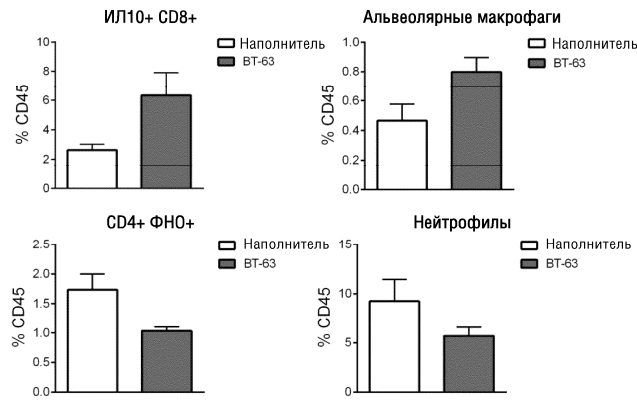


Фиг. 10

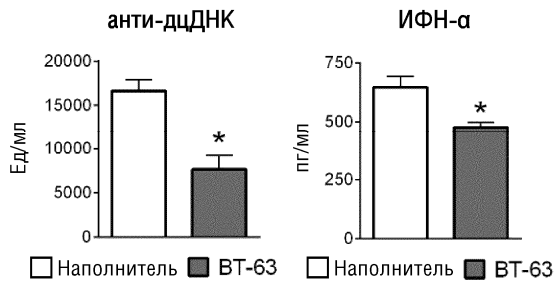
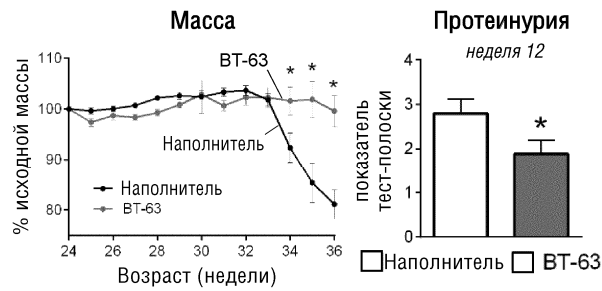




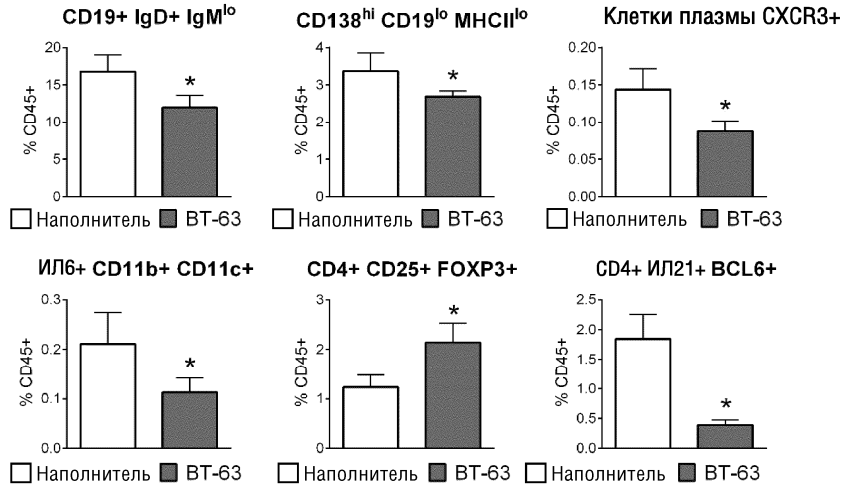
Фиг. 11



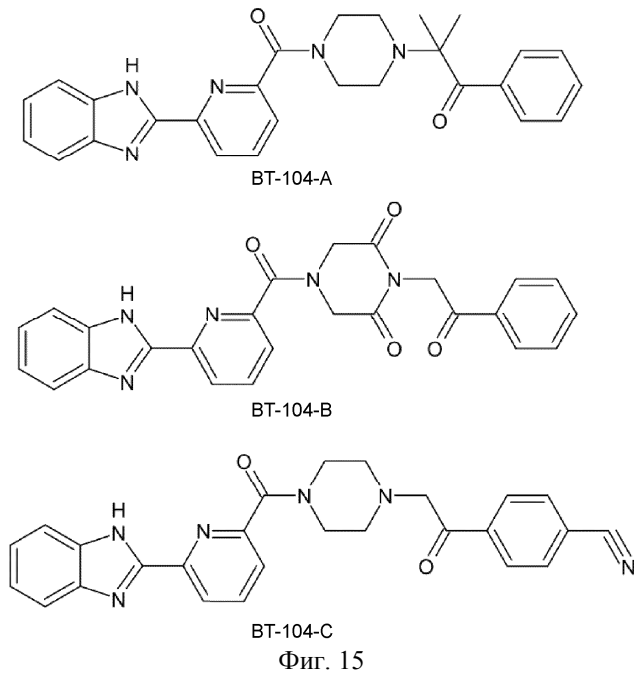
Фиг. 12



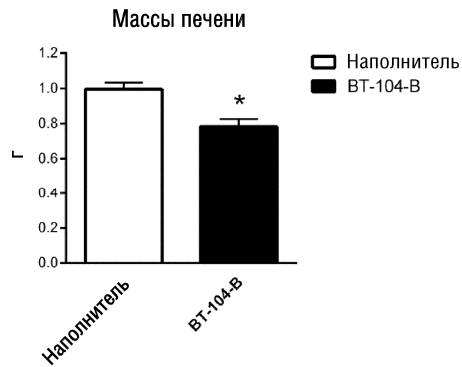
Фиг. 13



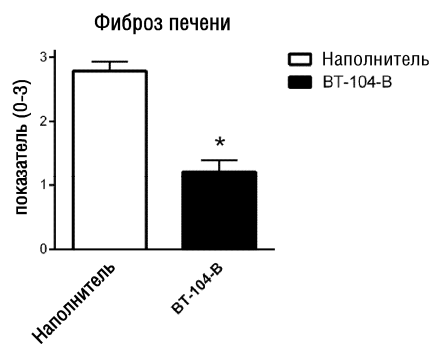
Фиг. 14



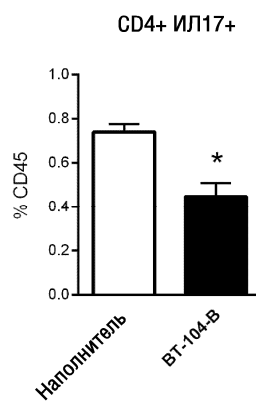
Фиг. 15



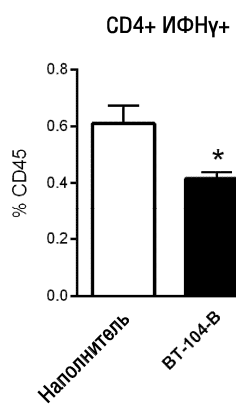
Фиг. 16А



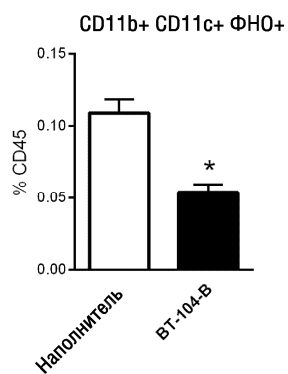
Фиг. 16В



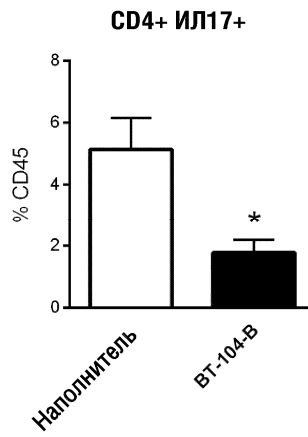
Фиг. 17А



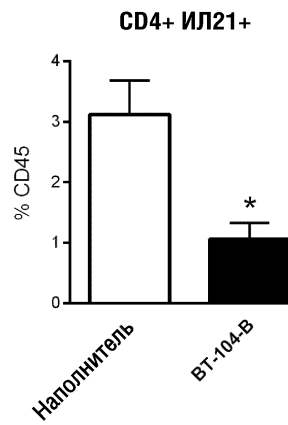
Фиг. 17В



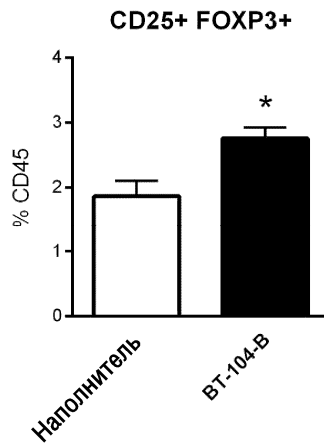
Фиг. 17С



Фиг. 18А



Фиг. 18В



Фиг. 18С

